

© Коллектив авторов, 2015

Т. С. Божок, Е. Н. Калинин, Б. Б. Кузьмицкий, М. Б. Голубева

СИНТЕЗ, ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ И ПРОТИВОЛЕЙКОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЗИДНЫХ АНАЛОГОВ АЗАЦИТИДИНА

ГНУ "Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси", Республика Беларусь, 220141, Минск, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2; e-mail: kalinichenko@iboch.bas-net.by

Получены новые модифицированные в углеводном фрагменте нуклеозидные аналоги азациитидина. В результате отборочного эксперимента выявлен высокоактивный 2'-фторсодержащий аналог азациитидина, который представляет интерес в качестве потенциального средства для терапии острого миелоцитарного лейкоза и миелодиспластического синдрома.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром; азациитидин; гликозилирование; фтордезоксинуклеозиды; гидролитическая стабильность; противолейкозная активность.

Особое место в терапии миелодиспластического синдрома (МДС) занимает эпигенетическая терапия. Под термином "эпигенетические" понимаются наследуемые изменения в клетках, которые не связаны с повреждением нуклеотидной последовательности генов и являются обратимыми, например, метилирование ДНК [1]. Одним из направлений эпигенетической терапии МДС является использование гипометилирующих агентов [2], к которым относятся азациитидин (5-азациитидин, Аза-Ц, видаза) и децитабин (2'-дезоксид-5-азациитидин, дакоген). Гипометилирующий эффект этих антиметаболитов реализуется через атом азота, которым замещен атом углерода в положении 5 цитозинового кольца, что делает невозможным присоединение метильной группы к этому участку аналога цитидина. Это приводит к ингибированию ДНК-метилтрансфераз. В результате происходит восстановление функций генов-онкосупрессоров и механизмов регуляции клеточного цикла в миелоидном ростке кроветворения [3, 4]. В настоящее время Аза-Ц является эффективным препаратом, входящим в состав терапии при лечении МДС, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), а также хронического миеломоноцитарного лейкоза без наличия признаков МДС. Кроме того, клиническая эффективность препарата доказана не только в отношении МДС, но и в отношении солидных опухолей в сочетании с другими методами лечения [5]. Ограничивающими факторами для широкого использования в медицинской практике Аза-Ц являются высокая общая токсичность и гидролитическая нестабильность при физиологических рН [6, 7]. Целью настоящего исследования является поиск в ряду модифицированных в углеводном фрагменте нуклеозидных аналогов Аза-Ц, обладающих более высокой противолейкозной активностью по сравнению с применяемым в химиотерапии опухолей Аза-Ц.

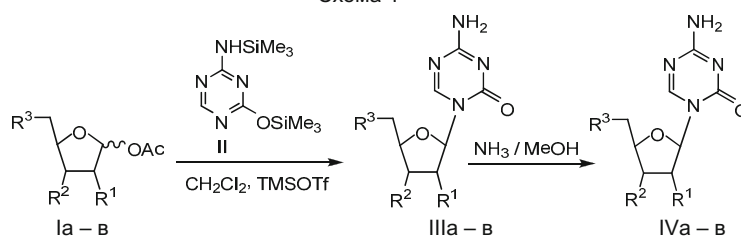
Известно, что введение атома фтора в биологически активные молекулы оказывает существенное влияние на физико-химические и биологические свойства таких молекул [8]. Повышение биологической активности может быть объяснено рядом факторов. Сродство к липофильной и одновременно к водной фазам ведет к повышению проницаемости через клеточные мембраны. Способность

к образованию водородных связей F...H, к электростатическому взаимодействию, влияние на стереоэффекты и конформацию соединений также является причиной особых биологических свойств фторированных нуклеозидов. Следует отметить, что атом фтора служит биоизостером таких групп, как метильная, аминогруппа и гидроксильная, а биоизостерическая замена — один из подходов, используемых в медицинской химии для создания более эффективных и безопасных лекарств [9].

Особый интерес представляют и 5'-дезоксипроизводные пиримидиновых нуклеозидов, которые имеют широкий спектр противоопухолевой активности и обладают способностью селективно накапливаться в ткани опухоли (под действием опухолевого ангиогенного фактора тимидинфосфорилазы), что сводит к минимуму системное воздействие препарата на здоровые ткани организма [10].

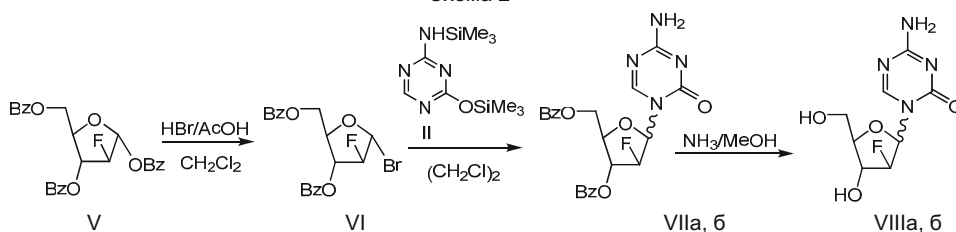
Нами синтезированы Аза-Ц и его нуклеозидные аналоги, которые включают модификации во 2'-, 3'- или 5'-положениях углеводного фрагмента. Конденсация 2,4-бис(триметилсилил)-5-азацитозина (II), синтезированного из 5-азацитозина, с соответствующими сахарами: 1-О-ацетил-2,3,5-три-О-бензоил-β-D-рибофуранозидом (Ia), 1,2,3-три-О-ацетил-5-дезоксид-β-D-рибофуранозидом (Iб), 1-О-ацетил-2,5-ди-О-бензоил-3-дезоксид-3-фтор-α/β-D-рибофуранозидом (Iв) или 3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-α-D-арабинофуранозил бромидом (VI), приводила к бензоильным производным IIIa – в и VIIa, б, которые были выделены в индивидуальном состоянии колоночной хроматографией на силикагеле. Дебензоилирование промежуточных нуклеозидов IIIa – в и VIIa, б аммиаком в метаноле приводило к Аза-Ц (IVa) и его 5'-дезоксидрибо-, 3'-фтордезоксидрибо- и 2'-фтордезоксидарабино-аналогам IVб, в и VIIIa, б соответственно (схемы 1, 2). Химическая структура синтезированных нуклеозидов установлена на основании данных ¹H, ¹⁹F ЯМР- (табл. 1), УФ- и масс-спектрометрии. Для установления стереохимических особенностей α/β-фторнуклеозидных аналогов Аза-Ц использовали КД-спектроскопию [11].

Схема 1



Ia: R¹ = R² = R³ = OBz, β-изомер; Ib: R¹ = R² = OAc, R³ = H, β-изомер; Ic: R¹ = R³ = OBz, R² = F, α/β-изомеры; IIIa: R¹ = R² = R³ = OBz; IIIб: R¹ = R² = OAc, R³ = H; IIIв: R¹ = R³ = OBz, R² = F; IVa: R¹ = R² = R³ = OH; IVб: R¹ = R² = OH, R³ = H; IVв: R¹ = R³ = OH, R² = F.

Схема 2



VIIa, VIIIa: β-изомер; VIIб, VIIIб: α-изомер.

Экспериментальная химическая часть

УФ-спектры сняты на спектрофотометре Varian Cary 100 (США) в диапазоне от 200 до 300 нм. ЯМР-спектры получены на спектрометре Bruker Avance-500 (США) с рабочей частотой 500 МГц для ¹H ЯМР и 470 МГц для ¹⁹F ЯМР. Масс-спектры получены на хромато-масс-спектрометре в составе системы ВЭЖХ Accela и масс-детектора LCQ Fleet с трёхмерной квадрупольной ионной ловушкой (Thermo Electron) в условиях ионизации электрораспылением. КД-спектры получены на спектрополяриметре Jasco J-20 (Япония).

Общая методика гликозилирования 5-азацитозина 1-О-ацилосахарами Ia – в. Суспензию 0,16 г (1,428 ммоль) 5-азацитозина и 0,01 г сульфата аммония в 6 мл гексаметилдисилазана (ГМДС) кипятят 10 ч, полученный гомогенный раствор упаривают в вакууме досуха, остаток повторно упаривают с безводным толуолом (10 мл). К остатку соединения II добавляют раствор соответствующего ацетата Ia – в (1,24 ммоль) в 6 мл безводного хлористого метилена, охлаждают до 0 °С и добавляют 0,26 мл (1,438 ммоль) триметилсилил-трифторметан-сульфоната. Реакционную смесь перемешивают 4 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона, затем разбавляют хлористым метиленом и выливают при перемешивании в охлажденный насыщенный водный раствор NaHCO₃. Органический слой и водную фазу экстрагируют хлористым метиленом. Органический экстракт сушат и упаривают в вакууме досуха. Остаток хроматографируют на силикагеле, используя для элюции сначала смесь этилацетат — гексан, 1:3, затем этилацетат — гексан — метанол, 30:90:7. Фракции, содержащие продукты реакции IIIa – в, объединяют и упаривают досуха.

4-Амино-1-(2,3,5-три-О-бензоил-β-D-рибофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IIIa). Выход 65 %, белая устойчивая пена. Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): 579,1 [M + Na]⁺ (100), 445,1 (65), 595,1 [M + K]⁺ (58).

4-Амино-1-(2,3-три-О-ацетил-5-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IIIб). Выход 80 %, бе-

лая устойчивая пена. Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): 335,1 [M + Na]⁺ (100), 201,1 (45), 351,1 [M + K]⁺ (27).

4-Амино-1-(2,5-ди-О-бензоил-3-дезоксид-3-фтор-β-D-рибофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IIIв). Выход 67 %, белая устойчивая пена. Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): 477,1 [M + Na]⁺ (100), 493,1 [M + K]⁺ (58), 343,1 (53), 150,1 (15).

Методика гликозилирования 5-азацитозина бромидом VI. Суспензию 0,215 г (1,92 ммоль) 5-азацитозина и 0,01 г сульфата аммония в 8 мл ГМДС кипятят 10 ч, гомогенный раствор упаривают в вакууме досуха, остаток повторно упаривают с безводным толуолом (10 мл). К остатку соединения II добавляют раствор бромида VI [получают из 0,7 г (1,51 ммоль) 1,3,5-три-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-α-D-арабинофуранозида (V)] в 7,5 мл безводного 1,2-дихлорэтана и кипятят 20 ч в атмосфере аргона. Затем реакционную смесь охлаждают, разбавляют хлороформом и выливают при перемешивании в ледяную воду. Органический слой и водную фазу экстрагируют хлороформом. Органический экстракт сушат и упаривают в вакууме досуха до образования устойчивой пены. Остаток хроматографируют на силикагеле, используя для элюции сначала этилацетат, а затем смесь хлороформ – петролейный эфир – метанол, 15:7:1. Фракции, содержащие продукты реакции VIIa, б, объединяют и упаривают досуха.

4-Амино-1-(3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (VIIa). Выход 82 %, белая устойчивая пена. Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): 477,1 [M + Na]⁺ (100), 455,1 [M + H]⁺ (64), 493,1 [M + K]⁺ (43), 343,1 (30), 150,1 (29).

4-Амино-1-(3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-α-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (VIIб). Выход 5 %, белый аморфный порошок. Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн}): 477,1 [M + Na]⁺ (100), 455,1 [M + H]⁺ (47), 493,1 [M + K]⁺ (38), 343,1 (37), 150,1 (31).

Общая методика дебензоилирования нуклеозидов IIIa – в и VIIa, б. К суспензии 0,318 ммоль соответствующих нуклеозидов IIIa – в или VIIa, б в 5 мл абсолют-

ного метанола добавляют 8 мл метанола, насыщенного сухим аммиаком при 0 °С, и перемешивают 7 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривают досуха и повторно упаривают с абсолютным метанолом. Остаток хроматографируют на силикагеле, используя для элюции линейный градиент метанола (0 → 30 %, v/v) в хлороформе. Фракции, содержащие продукт реакции, объединяют, упаривают досуха и остаток кристаллизуют из диэтилового эфира.

4-Амино-1-β-D-рибофуранозил-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IVa). Выход 60 %, белый аморфный порошок, т. пл. 228 – 230 °С (лит. 231 – 233 °С [12]). УФ-спектр (H₂O), λ_{макс}, нм (lgε): 241 (3,94). КД-спектр (H₂O), λ, нм ([θ · 10⁻³]): 215 (+ 2,04), 250 (+ 10,82), 285 (0). Масс-спектр, m/z (I_{отн}): 267,1 [M + Na]⁺ (100), 113,0 (81), 245,1 [M + H]⁺ (24).

4-Амино-1-(5-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IVб). Выход 92 %, белый аморфный порошок, т. пл. 212 – 214 °С. УФ-спектр (H₂O), λ_{макс}, нм (lgε): 242 (3,77). Масс-спектр, m/z (I_{отн}): 251,1 [M + Na]⁺ (100), 113,0 (52), 229,1 [M + H]⁺ (23).

4-Амино-1-(3-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (IVв). Выход 67 %, белый аморфный порошок, т. пл. 237 – 239 °С. УФ-спектр (H₂O), λ_{макс}, нм (lgε): 241 (3,94). КД-спектр (MeOH), λ, нм ([θ · 10⁻³]): 215 (0), 250 (+ 5,59), 280 (0). Масс-спектр, m/z

(I_{отн}): 269,1 [M + Na]⁺ (100), 113,0 (70), 247,1 [M + H]⁺ (23), 285,0 [M + K]⁺ (11).

4-Амино-1-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (VIIIa). Выход 75 %, белый аморфный порошок, т. пл. 204 – 206 °С. УФ-спектр (H₂O), λ_{макс}, нм (lgε): 241 (3,94). КД-спектр (MeOH), λ, нм ([θ · 10⁻³]): 215 (+ 2,15), 245 (+ 7,54), 285 (0). Масс-спектр, m/z (I_{отн}): 269,1 [M + Na]⁺ (100), 113,0 (59), 247,1 [M + H]⁺ (33), 285,0 [M + K]⁺ (27).

4-Амино-1-(2-дезоксид-2-фтор-α-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он (VIIIб). Выход 78 %, белый аморфный порошок. УФ-спектр (H₂O), λ_{макс}, нм (lgε): 241 (3,94). КД-спектр (MeOH), λ, нм ([θ · 10⁻³]): 215 (- 3,45), 240 (- 4,63), 285 (0). Масс-спектр, m/z (I_{отн}): 269,1 [M + Na]⁺ (100), 113,0 (59), 247,1 [M + H]⁺ (33), 285,0 [M + K]⁺ (27).

Гидролитическая стабильность изучена с применением метода ВЭЖХ [13]. Растворы соединений IVa – в и VIIIa концентрацией 0,082 · 10⁻⁴ моль/л готовили в инъекционной воде (рН 6,7), фосфатном буферном растворе (рН 3,2) и боратном буферном растворе (рН 10,2). Хроматограммы ВЭЖХ получены на хроматографе Waters со спектрофотометрическим детектором Waters 996. Для хроматографирования использовали колонку EC 250/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec (Macherey-Nagel AG), заполненную силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм; подвижную фазу: мета-

Т а б л и ц а 1

Спектры ¹H ЯМР и ¹⁹F ЯМР соединений III – IVa – в и VII-VIIIa, б

Соединение	Спектр ¹ H ЯМР*, δ, м.д., J, Гц	Спектр ¹⁹ F ЯМР*, δ, м.д.
IIIa	8,18 (с, 1H, H6), 8,08 – 7,33 (м, 15H, аром.), 6,79 (уш.с, 1H, NH ^a), 6,07 (д, 1H, J 4,0, H1'), 5,99 (т, 1H, H2'), 5,91 (м, 1H, J 4,0, J 5,9, H3'), 5,78 (уш.с, 1H, NH ^b), 4,81 (дд, 1H, J 3,0, J 12,0, H5'), 4,77 (м, 1H, H4'), 4,71 (дд, 1H, J 4,7, H5'')	–
IIIб	8,37 (с, 1H, H6), 7,72 (д, 2H, J 22,0, NH ₂), 5,60 (д, 1H, J 3,5, H1'), 5,54 (м, 1H, J 6,3, H2'), 5,17 (т, 1H, H3'), 4,06 (м, 1H, H4'), 2,06 (д, 6H, J 2,3, OAc), 1,31 (д, 3H, J 6,2, CH ₃)	–
IIIв	8,08 (с, 1H, H6), 8,08 – 7,44 (м, 10H, аром.), 7,02 (уш.с, 1H, NH ^a), 5,96 (д, 1H, J 4,5, H1'), 5,78 (уш.с, 1H, NH ^b), 5,77 (м, 1H, J 10,1, H2'), 5,67 (дт, 1H, J 53,1, H3'), 4,73 (дд, 1H, J 3,5, H5'), 4,69 (дм, 1H, J 20,8, H4'), 4,63 (дд, 1H, J 4,8, J 12,0, H5'')	– 202,38 (м, FC3')
VIIIa	8,30 (д, 1H, J 1,6, H6), 8,08 – 7,44 (м, 10H, аром.), 6,53 (уш.с, 1H, NH ^a), 6,37 (дд, 1H, J 2,4, J 21,5, H1'), 5,87 (уш.с, 1H, NH ^b), 5,62 (дд, 1H, J 16,3, H3'), 5,42 (дд, 1H, J 49,7, H2'), 4,81 (дд, 1H, J 5,3, J 12,0, H5''), 4,76 (дд, 1H, J 3,6, H5'), 4,55 (м, 1H, H4')	– 201,27 (м, FC2')
VIIIб	8,46 (с, 1H, H6), 8,02 – 7,51 (м, 12H, аром., NH ₂), 6,11 (д, 1H, J 16,4 Гц, H1'), 5,79 – 5,67 (м, 2H, J 50,8, J 18,0, H2', H3'), 5,22 (м, 1H, H4'), 4,61 (дд, 1H, J 3,9, J 12,0, H5'), 4,55 (дд, 1H, J 5,4, H5'')	– 186,58 (м, FC2')
IVa	8,58 (с, 1H, H6), 7,53 (д, 2H, J 11,0, NH ₂), 5,66 (д, 1H, J 3,6, H1'), 5,43 (д, 1H, J 5,0, 2'OH), 5,12 (т, 1H, J 4,9, 5'OH), 5,04 (д, 1H, J 5,8, 3'OH), 4,08 – 3,98 (м, 2H, H2', H3'), 3,84 (м, 1H, H4'), 3,68 (м, 1H, H5'), 3,54 (м, 1H, H5'')	–
IVб	8,25 (с, 1H, H6), 7,57 (д, 2H, J 4,8, NH ₂), 5,56 (д, 1H, J 3,7, H1'), 5,34 (д, 1H, J 4,7, 2'OH), 5,02 (д, 1H, J 5,9, 3'OH), 4,15 (м, 1H, J 5,2, H2'), 3,84 (м, 1H, H3'), 3,74 (м, 1H, H4'), 1,27 (д, 3H, J 6,3, CH ₃)	–
IVв	8,49 (с, 1H, H6), 7,66 (д, 2H, J 11,9, NH ₂), 5,83 (д, 1H, J 6,0, 2'OH), 5,79 (д, 1H, J 7,2, H1'), 5,25 (т, 1H, J 5,1, 5'OH), 4,99 (дд, 1H, J 54,3, H3'), 4,45 (дт, 1H, J 23,4, H2'), 4,18 (дм, 1H, J 25,3, H4'), 3,61 – 3,60 (м, 2H, H5', H5'')	– 199,43 (м, FC3')
VIIIa	8,31 (с, 1H, H6), 7,63 (д, 2H, J 3,2, NH ₂), 6,04 (дд, 1H, J 3,7, J 17,5, H1'), 5,86 (д, 1H, J 4,8, 3'OH), 5,05 (т, 1H, J 5,8, 5'OH), 4,97 (дм, 1H, J 2,3, J 52,1, H2'), 4,18 (дм, 1H, J 14,4, H3'), 3,79 (м, 1H, H4'), 3,58 (м, 1H, H5'), 3,51 (м, 1H, J 12,0, H5'')	– 197,43 (м, FC2')
VIIIб	8,23 (с, 1H, H6), 7,61 (д, 2H, J 10,0, NH ₂), 5,84 (дд, 1H, J 1,5, J 15,8, H1'), 5,77 (д, 1H, J 4,1, 3'OH), 5,18 (дт, 1H, J 50,9, H2'), 5,01 (т, 1H, J 5,6, 5'OH), 4,33 (м, 1H, H4'), 4,28 (дм, 1H, J 19,9, H3'), 3,49 – 3,47 м (2H, H5', H5'')	– 186,58 (м, FC2')

* IIIa, в и VIIIa — CDCl₃; IVa – в, IIIб, VIIIб и VIIIa, б — DMSO-d₆.

нол — раствор 2,72 г/л калия дигидрофосфата, доведенный до pH 6,8 с помощью триэтиламина (50:950, v/v); скорость подвижной фазы — 1 мл/мин; хроматограммы записаны при длине волны 241 нм; объем вводимой пробы 5 мкл; время хроматографирования 20 мин; температура колонки 25 °С. Пики примесей идентифицировали сравнением хроматограмм испытуемого раствора с хроматограммами растворов стандартов USP: 5-азацитозина, Аза-Ц и пикрата 1-β-D-рибофуранозил-3-гуанилмочевинны. Дополнительно записывались хроматограммы испытуемого раствора и продуктов разложения на хромато-масс-спектрометре.

Экспериментальная биологическая часть

Первичный скрининг противолейкозной активности синтезированных соединений IVa – в и VIIa проводили *in vitro* с использованием стандартных методов исследования [14, 15]. Для изучения специфической цитотоксической активности синтезированных нуклеозидов были использованы клеточные линии опухолей человека из банка клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург: KG-1 (клетки острой миелогенной лейкемии), ТРН-1 (клетки острой моноцитарной лейкемии), HL-60 (клетки острой промиелоцитарной лейкемии), K-562 (клетки хронического миелогенного лейкоза) и MOLT-3 (клетки острого Т-лимфобластного лейкоза). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 20 эмбриональной телячьей сыворотки для HL-60, KG-1 и MOLT-3, с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки – для ТРН-1 и K-562.

Цитотоксическую активность соединений изучали в концентрациях 0,01 – 50,0 мкМ. Препаратом сравнения являлась субстанция Аза-Ц, полученная по разработанному методу. Растворы тестируемых соединений вносили в лунки 96-луночного планшета с лейкозными клетками ($1,5 \cdot 10^5$ клеток/мл) в трехкратной повторности в объемах 10 мкл и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 48 и 72 ч. По окончании культивирования клеток с тестируемыми нуклеозидами в каждую лунку вносили готовый раствор МТТ в фосфатном буфере и дополнительно инкубировали в течение 4 ч. После этого клетки осаждали центрифугированием, среду из лунок удаляли и в каждую лунку добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность растворенного формазана измеряли на ридере “Витязь” (РБ) для многолуночных планшетов при длине волны 570 нм.

Таблица 2
Время, необходимое для снижения концентрации Аза-Ц и его нуклеозидных аналогов VIIa и IVb, в на 10, 20 и 30 % в воде для инъекций при 21 °С

Остаточное количество, %	Время, мин			
	IVa (Аза-Ц)	VIIa (2'F-ара-Аза-Ц)	IVb (3'F-Аза-Ц)	IVb (5'-дезоксид-Аза-Ц)
90	25 ± 1,2	43 ± 1,7*	12 ± 0,5*	65 ± 3,1*
80	80 ± 3,9	89 ± 4,2	30 ± 1,5	175 ± 8,2
70	350 ± 14,8	360 ± 15,1	75 ± 3,4	...

* Достоверное отличие от вещества сравнения ($p < 0,05$).

Для каждой концентрации тестируемого соединения вычисляли среднее значение из 3 параллельных измерений и строили графики зависимости степени подавления роста клеток от логарифма lg концентрации. Для активных соединений графически определяли величину средней эффективной концентрации, приводящей к подавлению жизнеспособности 50 % лейкозных клеток (EC₅₀). Результаты изучения специфической цитотоксической активности *in vitro* нуклеозидных аналогов Аза-Ц представлены в табл. 3. Статистическую обработку экспериментального материала проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что нуклеозидный аналог VIIa (2'F-ара-Аза-Ц) в модельных системах роста клеток 3 линий острого миелогенного лейкоза человека проявил существенно более высокую степень ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с активностью аналогов IVb (3'F-Аза-Ц) и IVb (5'-дезоксид-Аза-Ц). Цитотоксический эффект данного нуклеозида также оказался значительно выше, чем широко используемого в настоящее время противолейкозного препарата Аза-Ц.

Нуклеозидный аналог 2'F-ара-Аза-Ц, как и препарат сравнения Аза-Ц, дозозависимо избирательно подавляет жизнеспособность клеток острого миелогенного лейкоза линии KG-1, острого моноцитарного лейкоза ТРН-1 и острого промиелоцитарного лейкоза HL-60. Клетки хронического миелогенного лейкоза K-562 обнаруживают низкую чувствительность к нуклеозиду 2'F-ара-Аза-Ц, тогда как Аза-Ц в тест-системе роста лейкозных клеток K-562 проявил практически такую же цитотоксическую активность как и в отношении клеток 3 линий острого миелогенного лейкоза. Клетки острого Т-лимфобластного лейкоза MOLT-3 оказались абсолютно резистентны как к новому нуклеозидному аналогу, так и к Аза-Ц.

Следует отметить, что нуклеозидный аналог 2'F-ара-Аза-Ц проявляет выраженный цитотоксический эффект в отношении клеток острого миелогенного лейкоза в концентрации 0,1 мкМ, тогда как пороговая концентрация Аза-Ц составляет 1,0 мкМ. С увеличением концентрации тестируемого нуклеозида до 1,0 мкМ достигается эффект насыщения. Насыщающая концентрация азациитидина на

Таблица 3
Специфическая цитотоксическая активность новых нуклеозидных аналогов Аза-Ц в культурах клеток гемобластозов человека

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

* Достоверное отличие от вещества сравнения ($p < 0,05$); [#] н/а — неактивно.

порядок выше (10,0 мкМ) по сравнению с той же концентрацией нуклеозида 2'F-ара-Аза-Ц. Величины EC_{50} , отражающие концентрацию нуклеозида, которая обеспечивает 50 % ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с контролем, составили 0,35 мкМ (KG-1), 0,51 мкМ (ТРН-1), 0,58 мкМ (HL-60) для нуклеозида 2'F-ара-Аза-Ц и 3,66 мкМ (KG-1), 4,25 мкМ (ТРН-1), 5,37 мкМ (HL-60) для Аза-Ц, что указывает на 9–10 кратное усиление специфического цитотоксического эффекта нового аналога Аза-Ц по сравнению с контрольным препаратом.

Нуклеозидные аналоги 3'F-Аза-Ц и 5'-дезоксидеокси-Аза-Ц в концентрации 0,1 мкМ эффекта не проявляют, но в тест-системах высокочувствительных лейкозных клеток KG-1 в концентрациях 1,0 и 10,0 мкМ, соответственно, показали достоверный цитотоксический эффект, который, однако, с увеличением количества тестируемого вещества в культуре клеток не усиливается, а подвергается регрессии. Низкая цитотоксическая активность 5'-дезоксидеоксианалога IVб *in vitro*, вероятно, обусловлена отсутствием 5'-ОН группы в углеводном фрагменте соединения и отличным от Аза-Ц и его фтордезоксидеоксианалогов IVв и VIIIа метаболизмом.

Представленные в табл. 2 данные также свидетельствуют о том, что при нейтральном pH гидролитическая стабильность нуклеозидного аналога VIIIа, содержащего атом фтора при С-2' в арабино-конфигурации, в 1,7 раз выше, чем Аза-Ц. Время, необходимое для разложения 10 % соединения VIIIа, составляет 43 мин, тогда как для Аза-Ц этот предел достигается уже при 25 мин. Это является немаловажным показателем, т.к. период полувыведения Аза-Ц после подкожного введения составляет (41 ± 8) мин, достигая максимальной концентрации $C_{max} = (750 \pm 403)$ нг/мл через 0,5 ч после введения. Следует отметить, что гидролитическая стабильность нуклеозидного аналога 3'F-Аза-Ц заметно снижается по сравнению с изомерным арабино-аналогом. Очевидно, на химическую стабильность фторсодержащих аналогов азациитидина значительное влияние оказывают их конформационные особенности, вызванные введением атома фтора в углеводную часть молекулы. По-видимому, атом фтора в 5-азациитидиновых аналогах IVв и VIIIа, как и в случае 1-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-рибофуранозил)аденина и 1-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденина, наиболее эффективно смещает S ↔ N равновесие в сторону одного из конформеров [16]. Одним из основных структурных различий S и N конформеров является тот факт,

что в первом случае расстояние между гетерооснованием и экзоциклическим заместителем -5'CH₂OH существенно больше, чем в случае N конформера, и вполне вероятно, что внутримолекулярное взаимодействие между 5'-ОН группой и С6 положением триазинового кольца облегчает гидролиз с раскрытием цикла, в результате чего наблюдается более короткий период полураспада для фторнуклеозидов по сравнению с 5'-дезоксидеоксианалогом. Ранее показано, что внутримолекулярное взаимодействие между 5'-ОН группой и триазиновым кольцом децитабина облегчает его гидролиз с раскрытием кольца, в результате чего наблюдается более короткий период полураспада для бета-аномера по сравнению с альфа-аномером [17].

Таким образом, наиболее перспективным для дальнейшего исследования острой токсичности и противолейкозной активности *in vivo* является новый 2'-фторсодержащий аналог Аза-Ц — соединение VIIIа.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Д. Ширин, *Клин. онкогематол.*, **1**(1), 21–33 (2008).
2. G. S. Mack, *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**(20), 1443–1444 (2006).
3. J. K. Christman, *Oncogene*, **21**(35), 5483–5495 (2002).
4. E. A. Griffiths and S. D. Gore, *Semin. Hematol.*, **45**(1), 23–30, (2008).
5. J. Bauman, C. Verschraegen, S. Belinsky, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **69**(2), 547–554 (2012).
6. K. Raj and G. J. Mufti, *Ther. Clin. Risk Manag.*, **2**(4), 377–388 (2006).
7. J. A. Beisler, *J. Med. Chem.*, **21**(2), 204–208 (1978).
8. A. Strunecka, J. Patocka, and P. Connett, *J. Appl. Biomed.*, **2**(3), 141–150 (2004).
9. О. Н. Зефирова, Н. С. Зефилов, *Вестн. Моск. ун-та. Химия*, **43**(4), 251–256 (2002).
10. T. Ishikawa, Y. Fukase, T. Yamamoto, et al., *Biol. Pharm. Bul.*, **21**(7), 713–717 (1998).
11. Т. С. Божок, Е. Н. Калининченко, *Известия Нац. Академии наук Беларуси. Сер. хим. наук*, № 3, 60–65 (2014).
12. A. Piskala, F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**(9), 2060–2076 (1964).
13. Е. Н. Калининченко, Т. С. Божок, Т. Н. Буравская и др., *Труды Бел. гос. ун-та*, **8**(1), 235–240 (2013).
14. А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Ч. 1, Гриф и К, Москва (2012), сс. 640–654.
15. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1–2), 55–63 (1983).
16. J. E. van den Boogaart, E. N. Kalinichenko, T. L. Podkopaeva, et al., *Eur. J. Biochem.*, **221**(3), 759–768 (1994).
17. D. K. Rogstad, J. L. Herring, J. A. Theruvathu, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **22**(6), 1194–1204 (2009).

Поступила 28.10.14

SYNTHESIS, HYDROLYTIC DEGRADATION AND ANTILEUKEMIC ACTIVITY OF AZACITIDINE NUCLEOSIDE ANALOGS

T. S. Bozhok, E. N. Kalinichenko*, B. V. Kuz'mitskii, and M. B. Golubeva

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus;

* e-mail: kalinichenko@iboch.bas-net.by

New nucleoside analogs of azacitidine with modified carbohydrate moieties have been synthesized. The *in vitro* cytostatic activity of the obtained compounds was evaluated against a variety of leukemia cell lines. This screening revealed a highly active 2'-fluorine-containing analog of azacitidine that can be of interest as potential agent for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.

Keywords: myelodysplastic syndromes; azacitidine; glycosylation; fluoro-deoxy nucleosides; hydrolytic degradation; antileukemic activity.