

*На правах рукописи*

ШЕРСТЮК ЮЛИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО  $\beta$ -ФОСФАТУ  
ПРОИЗВОДНЫХ АДФ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИ(АДФ-  
РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2018



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Суперсемейство поли(АДФ-рибоза)полимераз (ПАРП) содержит, по крайней мере, 17 ферментов и играет значительную роль в многочисленных биологических процессах, включая репарацию ДНК, регуляцию транскрипции, регуляцию клеточного цикла, воспаление, реакцию на гипоксию и гибель клеток. Участие ПАРП в передаче сигнала и репарации поврежденных в ДНК, а также сверхактивация ферментов семейства ПАРП при патологических процессах инициировали разработку программ по поиску ингибиторов ПАРП, потенциально полезных при терапии инсульта, ишемии, диабета, воспаления и рака. В настоящее время основное внимание применению ингибиторов ПАРП уделяется в онкологии, о чем свидетельствует ряд доклинических и клинических данных, полученных в этой области.

ПАРП 1 – самый изученный член семейства ферментов ПАРП. ПАРП 1, также как и другие члены семейства ПАРП, использует никотинамидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>) в качестве субстрата для моно- и поли(АДФ-рибозил)ирования белков-акцепторов, в том числе самого ПАРП 1. Одним из структурных элементов НАД<sup>+</sup> и основным побочным продуктом реакции (АДФ-рибозил)ирования является никотинамид. Никотинамид ингибирует ПАРП 1, и на его основе разработана основная часть существующих ингибиторов ПАРП, в том числе одобренных FDA. Несмотря на огромное количество соединений – аналогов никотинамида, разработанных в качестве ингибиторов ПАРП 1-3, интерес к созданию новых ингибиторов ПАРП растет с каждым годом, о чем свидетельствует рост числа публикаций в научных журналах. Однако фармацевтическое использование существующих ингибиторов ПАРП до сих пор ограничено по ряду причин: наличие побочных эффектов, развитие резистентности опухолей к ингибиторам ПАРП; разная эффективность в комбинации с традиционными химиопрепаратами. Именно поэтому разработка новых структурных классов соединений с улучшенными свойствами, такими как селективность к различным типам ферментов ПАРП, повышенная эффективность действия, меньшая токсичность и более высокая биодоступность, остаются актуальной задачей.

В настоящей работе предложен новый класс соединений в качестве ингибиторов ПАРП 1, основанный на производных АДФ, модифицированных по β-фосфату. Выбор производных АДФ в качестве платформы для создания потенциальных ингибиторов ПАРП обусловлен структурой субстрата ферментов семейства ПАРП – НАД<sup>+</sup>. Молекула НАД<sup>+</sup> представляет собой пиродифосфат динуклеозида и состоит из трех структурных элементов: никотинамидрибозида, аденозина и пиродифосфатного фрагмента. В литературе нет данных по исследованию миметиков НАД<sup>+</sup> в качестве ингибиторов ПАРП. В тоже время структурные аналоги НАД<sup>+</sup>, 5',5'-пиродифосфаты динуклеозидов широко используются в поиске ингибиторов НАД-зависимых ферментов: ИМФ-дегидрогеназы, НАД<sup>+</sup>-киназы, бактериальной ДНК-лигазы, и CD38/НАД<sup>+</sup>-гликогидролазы. Также стоит отметить, что на основе полифосфатов динуклеозидов разработаны лекарственные препараты для лечения синдрома сухого глаза и кистозного фиброза.

Природные и модифицированные нуклеозиды и их фосфорилированные производные являются незаменимыми инструментами для поиска новых противораковых, противовирусных и противобактериальных лекарственных препаратов. Однако в литературе приведено малое количество работ по исследованию нуклеозидных производных в качестве ингибиторов ПАРП, хотя некоторые из них проявляют умеренную ингибирующую активность в отношении ПАРП 1. Так, при исследовании ингибирующих свойств производных тимидина, модифицированных по 5- и/или 5'-

положениям, обнаружено, что некоторые соединения обладают более высокой ингибирующей активностью в отношении ПАРП 1, чем 3-аминобензамид – ингибитор ПАРП 1 первого поколения и самый близкий структурный аналог никотинамида. Исследования 5',5'-полифосфатов диаденозина (ArpA, n=2-6) в качестве ингибиторов реакции АДФ-рибозилирования гистона H1 показали, что при увеличении числа фосфатных групп ArpA (с 2 до 4) происходит снижение остаточной активности ПАРП. Стоит отметить, что среди фосфорилированных производных аденозина – АМФ, АДФ, АТФ 5',3'-циклоАМФ и 5',3'-дифосфат аденозина, – наибольшую ингибирующую способность в отношении ПАРП 1 проявляет 5',3'-дифосфат аденозина. В литературе известны ингибиторы ПАРП 1 на основе производных изоиндолинона, аналога никотинамида, и на основе конъюгатов изоиндолинона, присоединенного по 5'-положению аденозина через различные спейсеры. При этом авторы отмечают, что конъюгаты изоиндолинона и аденозина проявляют более высокую ингибирующую активность в отношении ПАРП 1, чем производные изоиндолинона. Возможно, это связано с тем, что полученные ими конъюгаты содержат один из важных структурных элементов НАД+ – аденозин.

В связи с этим, нам представляются перспективными исследования фосфорилированных производных нуклеозидов – миметиков НАД+, а именно, модифицированных по β-фосфату производных АДФ, в качестве потенциальных ингибиторов ПАРП 1.

**Цель и задачи работы.** Цель работы: разработка подходов к созданию производных аденозин-5'-дифосфата, модифицированных по концевой фосфатной группе, в качестве потенциальных ингибиторов ПАРП 1.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Осуществить дизайн и синтез производных аденозин-5'-дифосфата, содержащих по концевой фосфатной группе остатки замещенных ароматических карбоновых кислот (серия **I**) или морфолиновые аналоги нуклеозидов (серия **II**), присоединенные через алифатический линкер.

2. Осуществить дизайн и синтез серии производных аденозин-5'-дифосфата, основанной на непосредственном связывании АДФ и остатка морфолинового нуклеозида (серия **III**).

3. Оценить влияние различных типов модификаций миметиков никотинамиднуклеозидного фрагмента в сериях **I-III** на ингибирующее действие производных аденозин-5'-дифосфата, модифицированных по концевой фосфатной группе, в реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования ПАРП 1.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В рамках работы в качестве потенциальных ингибиторов ПАРП 1 предложен новый класс соединений. В результате исследования создана библиотека из 66 новых производных аденозин-5'-дифосфата, модифицированных по β-фосфату, имитирующих субстрат ПАРП 1 НАД+. Оптимизирован метод образования пиррофосфатной связи в нуклеозидных производных. Усовершенствован протокол получения морфолиновых нуклеозидов из соответствующих рибонуклеозидов. Впервые получены 5-галогенурацилморфолиновые нуклеозиды из соответствующих рибонуклеозидов.

Полученная в результате работы библиотека миметиков НАД+ может быть использована при создании эффективных инструментов в исследованиях НАД+ зависимых ферментов, а также может служить основой для разработки новых эффективных ингибиторов ферментов семейства ПАРП. Разработанные синтетические подходы могут быть адаптированы для создания универсального метода образования

пирофосфатной связи. Исследования в области химии морфолиновых нуклеозидов могут помочь при синтезе морфолиновых олигонуклеотидов и их конъюгатов, функционализированных по гетероциклическим основаниям, с целью создания новых инструментов молекулярной биологии и потенциальных терапевтических агентов.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Создана библиотека из 66 соединений, содержащая три серии новых производных АДФ, имитирующих субстрат ПАРП I НАД+. Первая серия миметиков НАД+ (**I**) содержит производные ароматических карбоновых кислот, присоединенных к концевому фосфату АДФ через алифатический линкер. Вторая серия (**II**) включает в себя два типа морфолиновых аналогов нуклеозидов: 2'-аминометилморфолиновые (**IIa**) и 2'-аминометил-4'-карбоксиметилморфолиновые (**IIб**). Третья серия миметиков НАД+ (**III**) основана на непосредственном связывании аденозина и двух типов морфолиновых нуклеозидов – 2'-гидроксиметилморфолиновых (**IIIa**) и 2'-аминометилморфолиновых (**IIIб**) – через пирофосфатную связь.

2. Разработан универсальный подход к получению серий **I** и **II**, основанный на использовании общего соединения-предшественника – функционализованного конъюгата АДФ. Показано, что для образования пирофосфатной связи в нуклеозидных производных наиболее эффективным является подход, основанный на активации фосфатной группы редокс парой трифенилфосфин-дипиридилдисульфид в присутствии *N*-метилимидазола. Наиболее подходящей *N*-защитной группой в условиях *O*-монофосфорилирования аминспиртов является 9-флуоренилметоксикарбонильная группа в сравнении с тритильной, монометокситритильной и трифторацетильной.

3. Впервые получены морфолиновые нуклеозиды, содержащие 5-галогенурацил и 5-иодцитозин, из соответствующих галогенированных рибонуклеозидов. Способ получения исходных 5-иодпиримидиновых рибонуклеозидов влияет на лабильность атома иода в иодированных пиримидиновых гетероциклах при синтезе соответствующих морфолиновых нуклеозидов. Использование 5-иодуридина и 5-иодцитидина в качестве исходных соединений, полученных с использованием  $I_2/NaI$  в присутствии нитрата церия(IV)-аммония, не приводит к образованию деиодированных продуктов при синтезе соответствующих морфолиновых нуклеозидов. Ключевым фактором для получения морфолиновых нуклеозидов с высоким выходом является контроль pH в диапазоне 8.5-9 на стадии образования основания Шиффа.

4. Полученные миметики НАД+ умеренно ингибируют ПАРП I,  $IC_{50}$  40-474 мкМ. Наиболее эффективным ингибитором ПАРП I является конъюгат АДФ, содержащий остатки 2-(2-аминоэтокси)этанола и 2'-аминометил-4'-карбоксиметил-6'-(тимин-1-ил)морфолинового нуклеозида,  $IC_{50}$   $41.5 \pm 3.5$  мкМ. Увеличение длины линкерной группы оказывает положительное влияние на ингибирующие свойства соединений серий **I** и **II**. Включение в структуру линкерной группы оксалиламидного остатка и изменение места присоединения морфолинового нуклеозида к молекуле АДФ существенно изменяет ингибирующую активность соединений серии **II**. Изменение типа связывания морфолинового нуклеозида с молекулой АДФ с фосфозфирной на фосфамидную связь и введение атома иода по 5-ому положению урацилсодержащего морфолинового нуклеозида в значительной степени повышает ингибирующую активность соединений серии **III**.

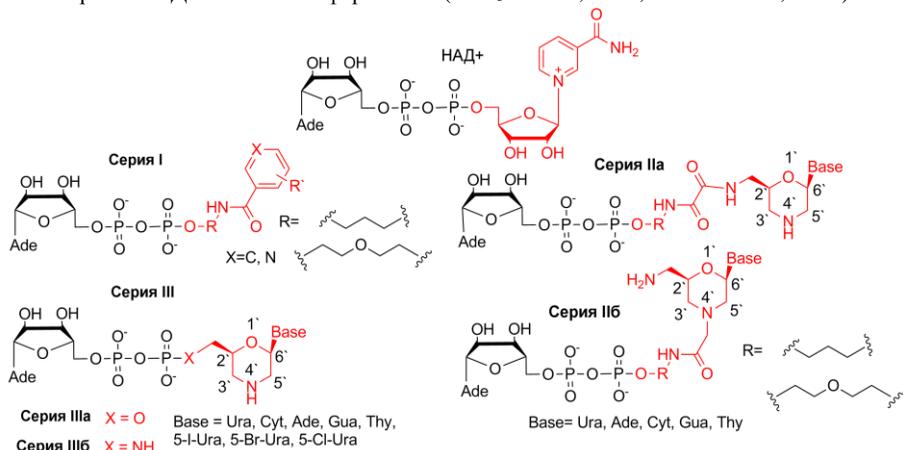
Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликованы 4 экспериментальные статьи и 1 обзор в международных рецензируемых журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на российских и международных конференциях: 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry, 6th Russian-Korean Conference "Current Issues of Biologically Active Compound Chemistry and Biotechnology"

(Новосибирск, Россия, 2015), VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (Реховот, Израиль, 2015), 54-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2016 (Новосибирск, Россия, 2016), кластер конференций по органической химии ОргХим-2016 (Санкт-Петербург, Россия, 2016), международная конференция "Химическая биология" (Новосибирск, Россия, 2016).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 173 страницах, содержит 24 рисунка, 38 схем и 4 таблицы. Библиография включает 246 литературных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Субстратом ПАРП является молекула НАД<sup>+</sup> (Рис. 1). Структура НАД<sup>+</sup> представляет собой 5',5'-пирофосфат динуклеозида, состоящий из остатков аденозина и никотинамидрибозида, соединенных 5',5'-пирофосфатной связью. Практически все существующие ингибиторы ПАРП является структурными аналогами никотинамида и взаимодействуют с аминокислотами никотинамид-связывающего участка каталитического центра фермента, не затрагивая при этом аденозин- и фосфатсвязывающие участки. Согласно литературным данным (*Ekblad et al., 2013*), соединения, взаимодействующие со всеми тремя участками НАД<sup>+</sup>-сайта каталитического центра фермента, могут проявлять более эффективное ингибирующее действие в отношении ПАРП 1. В литературе нет данных по исследованию соединений, содержащих все три части молекулы НАД<sup>+</sup>, т.е. структурных аналогов НАД<sup>+</sup>, в качестве ингибиторов ПАРП. Однако известно, что 5',5'-пирофосфаты динуклеозидов, представляющие собой аналоги НАД<sup>+</sup>, являются ингибиторами НАД<sup>+</sup>-зависимых ферментов (*Felczak et al., 2011; Bonnac et al., 2007*).



**Рисунок 1.** Структура НАД<sup>+</sup> и конъюгатов АДФ серий I, II, III.

В настоящей работе мы предлагаем новый класс потенциальных ингибиторов ПАРП на основе производных аденозин-5'-дифосфата, модифицированных по концевой фосфатной группе (Рис. 1). Эти соединения являются структурными аналогами НАД<sup>+</sup>, где вместо никотинамидрибозида используются различные остатки, имитирующие углеводную часть и агликон никотинамидрибозида. Для исследования влияния различных

миметиков никотинамиднуклеозидного фрагмента на взаимодействие таких соединений с ПАРП 1 создано три серии производных АДФ, модифицированных по концевой фосфатной группе.

Первая серия (**I**) содержит производные ароматических карбоновых кислот, присоединенные по  $\beta$ -фосфату АДФ через алифатический линкер. Бензамид и его производные, содержащие заместители по 2, 3, 4 положениям бензольного кольца, проявляют ингибирующие свойства в отношении ПАРП 1. Мы использовали 17 ароматических карбоновых кислот с различными заместителями по ароматическому кольцу в качестве структурных аналогов никотинамида. В качестве соединяющего фрагмента между молекулой АДФ и производными ароматических карбоновых кислот мы предлагаем использование алифатической линкерной группы вместо углеводного фрагмента – рибозы.

Вторая серия (**II**) миметиков НАД<sup>+</sup> основана на использовании двух типов морфолиновых аналогов нуклеозидов, имитирующих никотинамидрибозид. Серия **IIa** содержит 2'-аминометилморфолиновые нуклеозиды, присоединенные к молекуле АДФ через алифатический линкер в сочетании с остатком щавелевой кислоты. Точками соединения в молекуле АДФ является  $\beta$ -фосфат, а в молекуле морфолинового нуклеозида – 2'-аминометильная группа. Вторым типом морфолиновых нуклеозидов в серии **II** являются 2'-аминометил-4'-карбоксиметилморфолиновые нуклеозиды (**IIб**). Использование такого типа морфолиновых нуклеозидов позволило изменить точку соединения морфолинового нуклеозида с молекулой АДФ. В серии **IIб** точкой соединения молекулы морфолинового нуклеозида является 4'-положение, что способствует изменению положения морфолинового нуклеозида в пространстве.

При исследовании ингибирующей активности 5',5'-полифосфатов диаденозина в реакции АДФ-рибозилирования гистона H1 обнаружено, что при  $n=4-6$  происходит снижение ферментативной активности (*Tanaka et al., 1981*). В связи с этим, в сериях **I** и **II** мы использовали алифатические линкерные группы различной длины для определения влияния расстояния между нуклеозидными частями молекулы на ингибирующие свойства миметиков НАД<sup>+</sup>.

В литературе описаны примеры использования 5',5'-пирофосфатов динуклеозидов в качестве ингибиторов или субстратов НАД-зависимых ферментов (*Pergolizzi et al., 2015; Wang et al., 2014*). Поэтому третья серия (**III**) предложенных нами производных АДФ основана на непосредственном связывании аденозина и морфолиновых нуклеозидов через пирофосфатную связь без дополнительного линкера. При этом серия **III** включает в себя два типа морфолиновых нуклеозидов: 2'-гидроксиметил- (**IIIa**) и 2'-аминометилморфолиновые (**IIIб**) нуклеозиды. В рамках этой серии мы предлагаем исследовать влияние изменения расположения молекулы АДФ по отношению к молекуле морфолинового нуклеозида за счет изменения 2'-гидроксиметильной группы на 2'-аминометильную группу.

Использование морфолиновых нуклеозидов для конструирования миметиков НАД<sup>+</sup> серий **II** и **III** обусловлено их широким применением для синтеза миметиков нуклеиновых кислот, в том числе проходящих клинические испытания для лечения различных патологий. В то же время этот тип модифицированных нуклеозидов в виде мономеров или низкомолекулярных конъюгатов практически не изучен в качестве ингибиторов каких-либо биохимических процессов.

Ключевой стадией синтеза соединений серий **I**, **II**, **IIIa** является образование пирофосфатной связи между АМФ и фосфатной группой нуклеотидного или нуклеотидного производного. Поэтому первой задачей нашего исследования являлась

оптимизация метода образования пирофосфатной связи в фосфатных производных нуклеозидов.

## 1. Оптимизация метода образования пирофосфатной связи в фосфатных производных нуклеозидов

К настоящему моменту разработано огромное количество методов образования пирофосфатной связи. Химические методы образования пирофосфатной связи основаны на взаимодействии двух фосфатных групп, одна из которых содержит некую активную форму фосфора P(III) или P(V). В качестве модельного соединения для отработки метода образования пирофосфатной связи мы выбрали 5',5'-пирофосфат аденозина и 3'-азидотимидина, соединение **1**, rAp2dT(3'-N<sub>3</sub>) (Схема 1). Ключевой стадией является реакция конденсации между фосфатной группой одного нуклеозида и активным фосфатным производным другого нуклеозида. Поскольку АМФ (**2**) является более доступным реагентом, то активное производное фосфатной группы получали на основе 3'-азидотимидина (**3**). Активное производное монофосфата 3'-азидотимидина возможно получить двумя способами: 1) путем образования непосредственно из нуклеозида и 2) путем активации монофосфатной группы нуклеотида.

### 1.1. Способ 1. Образование активированного производного фосфата из нуклеозида.

Одним из самых высоко реакционноспособных производных фосфора (V) является дихлорфосфат. В основе метода лежит реакция монофосфорилирования 5'-гидроксильной группы нуклеозидов хлорокисью фосфора (V) в триалкилфосфате или в пиридине. Образующийся при этом дихлорфосфат нуклеозида *in situ* реагирует с фосфатной группой неорганического пиро- или трифосфата.

Нами были предприняты попытки применения этого типа активного производного для получения пирофосфатов динуклеозидов, содержащих в своей структуре один природный нуклеозид, аденозин, и модифицированный нуклеозид, 3'-азидотимидин (**3**). 3'-Азидотимидин (**3**) не требует введения защитных групп, поскольку содержит только одну первичную гидроксильную группу по 5'-положению, а гетероциклическое основание не содержит экзоциклических аминогрупп. Реакцию монофосфорилирования соединения **3** проводили под действием POCl<sub>3</sub> (1.2 экв.) в пиридине в течение 15 минут при охлаждении на ледяной бане (Схема 1). Затем реакцию смесь монофосфорилирования добавляли к раствору *n*-Bu<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> соли АМФ (**2**, 1 экв) в пиридине. Реакционную смесь выдерживали в течение 2 часов при комн. температуре, затем разлагали 1 М ТЭАБ и упаривали. В спектре <sup>31</sup>P ЯМР реакционной смеси обнаружены сигналы дизамещенных пирофосфатов, δ(<sup>31</sup>P) - 10.8 – (-11.8) м.д., и моноэфиров фосфорной кислоты, δ(<sup>31</sup>P) 1.8 – (-1.8) м.д. Разделение продуктов реакции проводили методами анионообменной хроматографии (АОХ) и обращенно-фазовой хроматографии и (ОФХ). Согласно данным спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P среди продуктов реакции пирофосфат **1** не обнаружен. Возможно, это связано с неполным монофосфорилированием 3'-азидотимидина (**3**).

В литературе известен метод селективного монофосфорилирования 5'-гидроксильной группы *природных* незащищенных нуклеозидов с выходами от 88 до 98 % (Yoshikawa *et al.*, 1967). Метод основан на использовании POCl<sub>3</sub> в триалкилфосфате. Региоселективность

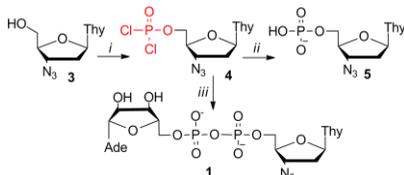


Схема 1. Синтез rAp2dT(3'-N<sub>3</sub>) с использованием 5'-дихлорфосфата 3'-азидотимидина. Реагенты: (i) POCl<sub>3</sub>; (ii) 1М ТЭАБ; (iii) АМФ.

реакции объясняется образованием комплекса нуклеозид-триалкилфосфат. Однако этот метод хорошо работает только с *природными* нуклеозидами. При введении модификаций по гетероциклическому основанию и/или углеводному остатку реакция монофосфорилирования протекает с меньшим выходом или вовсе не проходит.

Монофосфорилирование 3'-азидотимидина (**3**) проводили по методу Yoshikawa в триметилфосфате с  $\text{POCl}_3$  (1.2 экв.). Однако, мы не наблюдали протекания реакции в этих условиях. Увеличение времени реакции (до 24 ч), увеличение температуры (с  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  до  $+25\text{ }^\circ\text{C}$ ) и использование большего количества  $\text{POCl}_3$  (до 3 экв.) не способствовало монофосфорилированию гидроксильной группы и образованию каких-либо продуктов. Добавление избытка  $n\text{-Bu}_3\text{N}$  (3 экв.) привело к монофосфорилированию 5'-гидроксильной группы соединения **3**. Чтобы оценить степень образования дихлорфосфата **4** образец реакционной смеси разлагали водой, при этом образуется монофосфат нуклеозида **5** (Схема 1), по количеству которого определяли степень образования интермедиата **4**. Степень образования монофосфата нуклеозида **5** составляла 40-50 % по данным ВЭЖХ.

Таким образом, синтез пирозината **1** проводили в 2 стадии. На первой стадии 3'-азидотимидин **3** (1 экв.) обрабатывали  $\text{POCl}_3$  (1.2 экв.) в присутствии  $n\text{-Bu}_3\text{N}$  (3 экв.) в триметилфосфате в течение 30 мин при охлаждении на ледяной бане. На второй стадии проводили конденсацию *in situ* интермедиата **4** с АМФ (**2**, 3 экв.) в триметилфосфате. Очистку целевого продукта **1** проводили при помощи двух хроматографий, АОХ и ОФХ. Выход соединения **1** составил 25 %. В случае использования меньших количеств АМФ (0.5-1.5 экв.) пирозинат **1** среди продуктов реакции не был обнаружен.

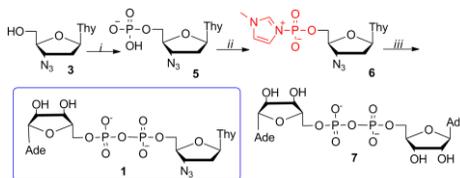
## **1.2. Способ 2. Образование активированного производного фосфата путем активации 5'-монофосфата нуклеозида.**

Как сказано ранее, получение активного фосфатного производного возможно осуществить путем активации монофосфатной группы нуклеотида. Для реализации этого способа на первой стадии необходимо провести монофосфорилирование 5'-гидроксильной группы 3'-азидотимидина (**5**). При использовании метода Yoshikawa,  $\text{POCl}_3$  в триметилфосфате, степень образования монофосфата **5** не превышала 40-50 %, также в реакционной смеси присутствовал исходный 3'-азидотимидин **3**. Увеличение количества  $n\text{-Bu}_3\text{N}$  (5-10 экв.) не способствовало образованию монофосфата **5**.

Монофосфорилирование соединения **3** проводили под действием  $\text{POCl}_3$  (2 экв.) в пиридине при охлаждении на ледяной бане. Однако выход соединения **5** не превышал 50 % после очистки методом ОФХ. Варьируя условия проведения реакции монофосфорилирования, – количество  $\text{POCl}_3$  (2-4 экв.), температура ( $0 - -15\text{ }^\circ\text{C}$ ) и время (5-30 мин), – мы обнаружили, что практически количественное монофосфорилирование происходит при использовании 4 экв.  $\text{POCl}_3$  за 15 мин при  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ . Выход целевого монофосфата **5** составил 80 % после очистки методом ОФХ (Схема 2).

Самым широко используемым типом активных производных монофосфатов является фосфоимидазолиды. Одними из самых явных недостатков использования фосфоимидазолидов являются длительное время реакции и различные выходы целевых продуктов. Использование  $N\text{-MeIm}$  вместо имидазола на стадии активации фосфатной группы приводит к образованию более активного интермедиата, использование которого уменьшает времена реакции на стадии образования пирозинатной связи, однако требует проведения реакции в сухих условиях. В литературе описано несколько способов получения  $N$ -метилимидазолидных производных по фосфатной группе (Roy et al., 2016). Одним из них является использование редокс-пары  $\text{Ph}_3\text{P}(\text{PyS})_2$  (Abramova et al., 2007).

Активацию фосфатной группы соединения **5** проводили по действием  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  (3 экв.) в присутствии *N*-метилимидазола (*N*-MeIm) (12 экв.) (Схема 2). Интерmediат **6** возможно использовать для конденсации с АМФ *in situ* или после выделения (осаждения). В случае использования интерmediата **6** *in situ*, к смеси реакции активации добавляли раствор АМФ (4 экв.) в сухом ДМІ. Выход 5',5'-пирофосфата **1** составлял 80-75 % после хроматографической очистки. Помимо соединения **1** в ходе реакции образовался симметричный пирофосфат **7**. Выход соединения **7** составлял от 0 до 60 % в расчете на исходный АМФ. Образование соединения **7** и вариabельность его выхода можно объяснить присутствием в реакционной смеси избытков  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  и наличием/отсутствием следов воды. Использование меньших количеств  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  приводит к незначительному образованию производного **6**. Использование же меньших количеств АМФ приводит к неполному превращению интерmediата **6** в 5',5'-пирофосфат **1**.



**Схема 2.** Синтез  $\gamma\text{AP}_{2d}\text{T}(3'\text{-N}_3)$  с использованием фосфо(*N*-метилимидазольного производного 3'-азидотимидина. Реагенты: (i) 1)  $\text{POCl}_3$ , 2) 1 М ТЭАБ; (ii)  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$ , *N*-MeIm; (iii) АМФ.

Выделение *N*-метилимидазольного производного **6** осуществляли путем добавления к реакционной смеси  $\text{Et}_2\text{O}$ . После удаления супернатанта к образовавшемуся осадку добавляли раствор АМФ (1.2-1.5 экв.) в сухом ДМІ. Выход 5',5'-пирофосфата **1** составил 60 % после хроматографической очистки. Помимо целевого пирофосфата **1** из реакционной смеси удалось выделить 5'-монофосфаты 3'-азидотимидина и аденозина (**5** и **2**). Наличие монофосфата **5** возможно объяснить присутствием следов воды в используемых растворителях и реагентах. Преимуществом этого способа проведения реакции, с промежуточной очисткой производного **6** от избытка активирующих реагентов, является возможность повторного использования монофосфатов нуклеозидов **5** и **2**.

## 2. Синтез конъюгатов АДФ серий I и II

Серии I и II основаны на использовании общего соединения предшественника – конъюгата АДФ с аминоклинкером (Рис. 1). Для исследования влияния длины алифатического линкера на ингибирующие свойства соединений серий I и II предложено использование двух аминоклиперов: 2-(2-аминоэтокси)этанола (**8**) и 3-аминопропанола (**9**).

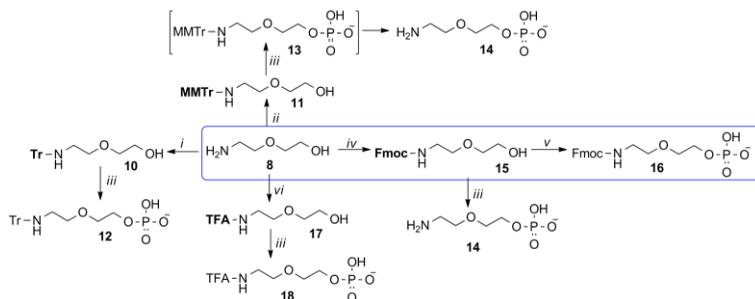
### 2.1. Синтез конъюгата АДФ с аминоклинкером

Ключевой стадией синтеза соединения конъюгата АДФ с аминоклинкером являлось образование пирофосфатной связи между АМФ и *O*-монофосфатом *N*-защищенного аминоклипера.

#### 2.1.1. Синтез *O*-монофосфата *N*-защищенного аминоклипера

В настоящее время известны различные способы монофосфорилирования спиртов, включая производные нуклеозидов. Для селективного *O*-фосфорилирования аминоклиперов, содержащих алифатическую аминогруппу, необходимо введение защитной группы по аминоклиперу. В ходе исследования мы протестировали 4 различные защитные группы в условиях монофосфорилирования 2-(2-аминоэтокси)этанола (**8**): тритильную (Tr), монометокситритильную (MMTr), 9-флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc) и трифторацетильную (TFA) группы (Схема 3). Tr- и MMTr-группы являются кислотолабильными защитными группами. Введение Tr- или MMTr-группы по

аминогруппе линкера **8** осуществляли под действием  $\text{TrCl}$  или  $\text{MMTrCl}$  (1,2 экв.), соответственно. Реакцию проводили в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  (3 экв.) в сухом DMF. Выход соединений **10** и **11** после хроматографической очистки составил 80-85 %. Монофосфорилирование *N*- $\text{Tr}$ -аминоспирта **10** проводили под действием  $\text{POCl}_3$  (3-4 экв.) в пиридине в течение 15 мин, при охлаждении на ледяной бане. По окончании реакции реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ. Целевой продукт **12** экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Выход монофосфата **12** составил 75 %. Поскольку условия деблокирования  $\text{Tr}$ -группы с первичной аминогруппы достаточно «жесткие» для нуклеозидных производных, мы попытались применить более лабильную  $\text{MMTr}$ -группу. Реакцию монофосфорилирования *N*- $\text{MMTr}$ -аминоспирта **11** проводили в пиридине с  $\text{POCl}_3$ . После разложения и упаривания реакционной смеси происходило частичное деблокирование  $\text{MMTr}$ -группы. При попытке выделить соединение **13** методом АОХ происходило полное деблокирование аминогруппы с образованием *O*-монофосфата аминспирта **14** (Схема 3).



**Схема 3.** Монофосфорилирование *N*-защищенного 2-(2-аминоэтокси)этанола. Реагенты (i) DMF,  $\text{TrCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; (ii) DMF,  $\text{MMTrCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; (iii) 1)  $\text{POCl}_3$ , Py, 2) 1 М ТЭАБ; (iv)  $\text{FmocCl}$ ; (v) 1)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeCN, 2)  $\text{H}_2\text{O}$ ; (vi)  $\text{CF}_3\text{COOEt}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH.

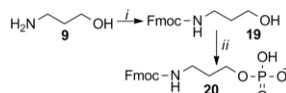
Преимуществом  $\text{Fmoc}$ -группы является возможность её удаления в мягких слабощелочных условиях. Монофосфорилирование *N*- $\text{Fmoc}$ -аминоспирта **15** проводили под действием  $\text{POCl}_3$  (3-4 экв.) в пиридине в течение 15 мин, при охлаждении на ледяной бане. По окончании реакции реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ. Однако получить монофосфат **16** не удалось, так как при упаривании реакционной смеси происходило полное деблокирование аминогруппы с образованием монофосфата **14** (Схема 3). Нами предложен альтернативный метод получения соединения **16**. Монофосфорилирование аминспирта **15** проводили с использованием  $\text{POCl}_3$  в сухом MeCN в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  (1 экв.) при комнатной температуре в течение часа. Реакционную смесь разлагали водой. После хроматографической очистки выход целевого монофосфата **16** составил 75-85 %.

$\text{TFA}$ -группа является менее лабильной по сравнению с  $\text{Fmoc}$ -группой. Введение  $\text{TFA}$ -группы по аминогруппе соединения **8** проводили в метаноле под действием  $\text{CF}_3\text{COOEt}$  в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  (Схема 3). Выход соединения **17** после хроматографической очистки составил 80 %. Реакцию монофосфорилирования проводили в пиридине с  $\text{POCl}_3$ . Выход *O*-монофосфата **18** после очистки методом ОФХ составил 80 %.

Таким образом, из 4 возможных монофосфатов, соединения **12**, **13**, **16**, **18**, нами получены только 3, соединения **12**, **16**, **18**. В условиях фосфорилирования ОН-группы под действием  $\text{POCl}_3$  в пиридине и очистки соответствующих монофосфатов стабильными защитными  $\text{NH}_2$ -группами являлись  $\text{Tr}$  и  $\text{TFA}$ , т.е соединения **12** и **18**. В случае  $\text{Fmoc}$ -группы (соединение **16**) подобраны оптимальные условия монофосфорилирования,  $\text{POCl}_3/\text{Et}_3\text{N}$  в MeCN. Несмотря на то, что нами успешно получен *O*-монофосфат *N*- $\text{Tr}$ -2-(2-

аминоэтокси)этанола **12** без хроматографических очисток, мы полагаем, что «жесткие» условия деблокирования могут повлиять на стабильность *N*-гликозидной связи аденозина. Нами также получен *O*-монофосфат *N*-TFA-2-(2-аминоэтокси)этанола **18** с высоким выходом. Несмотря на все преимущества данной защитной группы, «мягкие» условия введения и деблокирования, стабильность в условиях реакции монофосфорилирования, соединение **18** не содержит в своей структуре групп, вызывающих поглощение в УФ диапазоне 260-300 нм, что приводит к трудностям в детекции продуктов при хроматографической очистке. Преимуществом Fmoc-группы является возможность её удаления в мягких слабощелочных условиях. Оптимизировав условия монофосфорилирования соединения **15**, мы полагаем что самой эффективной защитной группой для получения *O*-монофосфата аминокислота является Fmoc-группа.

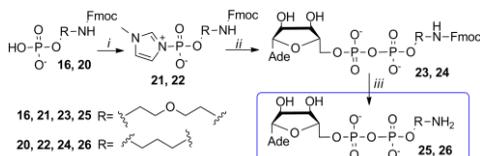
Для исследования влияния длины алифатического линкера на ингибирующие свойства соединений серий **I** и **II** предложено использование двух аминокислот: 2-(2-аминоэтокси)этанола (**8**) и 3-аминопропанола (**9**). Синтез *O*-монофосфата **20** (Схема 4) осуществляли аналогично соединению **16**. На первой стадии проводили введение Fmoc-защитной группы по аминогруппе 3-аминопропанола (**9**), затем монофосфорилирование соединения **19**. После хроматографической очистки выход целевого монофосфата **20** составил 75 %.



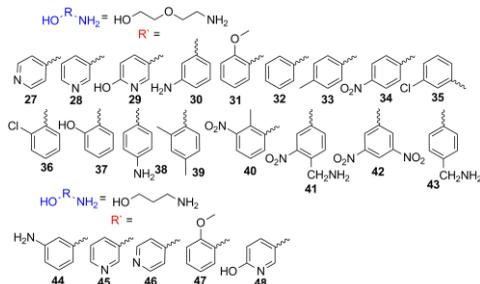
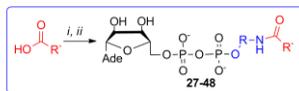
**Схема 4.** Синтез *O*-монофосфата *N*-Fmoc-аминопропанола. Реагенты: (i) FmocCl; (ii) POCl<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, MeCN.

**2.1.2. Образование пирофосфатной связи между АМФ и *O*-монофосфатом *N*-защитного аминокислотного линкера**

Синтез конъюгата **25/26** осуществляли путем активации фосфатной группы соединения **16/20** с последующим взаимодействием активного производного с АМФ (Схема 5). Реакцию активации соединения **16/20** проводили аналогично схеме 2. Интермедиат **21/22** использовали *in situ* в реакции АМФ (**2**). Выход пирофосфатов **23** и **24** после хроматографической очистки составил 80 и 61 %, соответственно. Деблокирование *N*-Fmoc-конъюгатов **23** и **24** проводили при помощи обработки конц. водным раствором NH<sub>3</sub> в течение 12 ч. Выход целевых конъюгатов АДФ **25** и **26** после деблокирования составил 93 и 92 %, соответственно.



**Схема 5.** Синтез конъюгатов АДФ с аминокислотным линкером. Реагенты: (i) Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub>, *N*-MeIm, DMI; (ii) АМФ; (iii) конц. водн. NH<sub>3</sub>.



**Схема 6.** Синтез соединений серии **I**. Реагенты: (i) DCC, HOSu, DMSO; (ii) **25/26**, 1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

конъюгатов АДФ **25** и **26**. В результате получено 22 конъюгата АДФ, модифицированных по β-фосфату, соединения **27-48**.

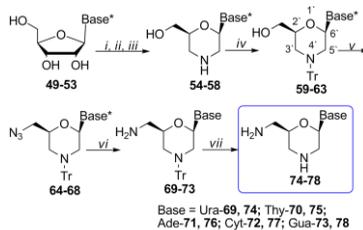
### 2.3. Синтез соединений серии II

Как сказано ранее, вторая серия (**II**) включает в себя два типа морфолиновых нуклеозидов, которые присоединены по β-фосфату АДФ через алифатический линкер, аналогично серии **I** (Рис. 1). Серия **IIa** основана на 2'-аминометилморфолиновых нуклеозидах. Серия **IIб** основана на 2'-аминометил-4'-карбоксиметилморфолиновых нуклеозидах.

#### 2.3.1. Синтез 2'-аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов

Синтез 2'-аминометилморфолиновых нуклеозидов **74-78** проводили в три этапа. На первом этапе получали 2'-гидроксиметилморфолиновые нуклеозиды **59-63** из соответствующих рибонуклеозидов **49-53** (Схема 7). В синтезе использовали защищенные по экзоциклическим аминогруппам гетероциклических оснований рибонуклеозиды **49-53** (в случае урацила и тимина защитная группа не требуется). Образование морфолинового кольца проходит в три стадии: окисление, аминирование и восстановление.

В литературе известен метод синтеза 4'-N-Tr-морфолиновых производных **59-63**, где в качестве исходных соединений используют 5'-O-защищенные рибонуклеозиды (Pattanayak et al., 2012). Авторы отмечают, что использование 5'-O-защищенных рибонуклеозидов приводит к увеличению выходов морфолиновых нуклеозидов, с 12 до 52 % для тиминового производного **60**. Также известен метод синтеза, основанный на использовании 5'-O-незащищенных рибонуклеозидов (Summerton et al., 1991).



Base = Ura-69, 74; Thy-70, 75; Ade-71, 76; Cyt-72, 77; Gua-73, 78

Base = Ura-49, 54, 59, 64; Thy-50, 55, 60, 65; Ade<sup>Bz</sup>-51, 56, 61, 66; Cyt<sup>Bz</sup>-52, 57, 62, 67; Gua<sup>Bz</sup>-53, 58, 63, 68

**Схема 7.** Синтез морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) NaIO<sub>4</sub>; (ii) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·4H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N; (iii) NaCNBH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>COOH; (iv) TrCl, Et<sub>3</sub>N; (v) Ph<sub>3</sub>P/CBrCl<sub>3</sub>; NaN<sub>3</sub>; (vi) 1) Ph<sub>3</sub>P/Py, 2) конц. водн. NH<sub>3</sub>; (vii) CH<sub>3</sub>COOH.

Синтез морфолиновых аналогов нуклеозидов **59-63** проводили аналогично протоколу Summerton с некоторыми изменениями (Схема 7). На первой стадии рибонуклеозиды **49-53** подвергали окислению NaIO<sub>4</sub> в течение 15 минут. При этом происходило быстрое окисление диольной группировки с разрывом связи между 2' и 3' атомами углерода и образованием соответствующих диальдегидных производных. Вторая стадия синтеза – замыкание морфолинового цикла с образованием основания Шиффа. К реакционной смеси периодатного окисления добавляли (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> и Et<sub>3</sub>N до значения pH реакционной смеси 8.5-9. Реакционную смесь выдерживали в течение 1.5 часов при тщательном контроле значения pH, которое поддерживали в диапазоне 8.5-9 путем добавления Et<sub>3</sub>N. На третьей стадии проводили восстановление с помощью NaCNBH<sub>3</sub> в течение 30-40 минут. После разложения реакционной смеси трифторуксусной кислотой образовались соединения **54-58**. Морфолиновые нуклеозиды **54-58** использовали без дополнительной очистки для введения Tr-защитной группы по 4'-NH-группе морфолинового кольца. Тритилирование NH-группы проводили при помощи TrCl с добавлением Et<sub>3</sub>N в сухом DMF. 4'-N-Tr-морфолиновые производные **59-63** получены с общим выходом 60-70 % без использования хроматографической очистки.

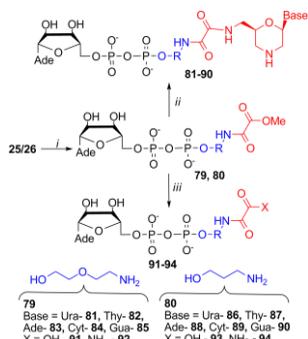
В результате работы по синтезу 4'-N-Tr-морфолиновых производных **59-63** нами сделан вывод, что тщательный контроль значения pH на стадии образования основания Шиффа приводит к увеличению выходов целевых соединений без дополнительной защиты 5'-гидроксигруппы исходных рибонуклеозидов.

Синтез 2'-аминометил-4'-N-Tr-морфолиновых нуклеозидов **69-73** из соответствующих морфолиновых нуклеозидов **59-63** проводили путем замены гидроксильной группы на азидогруппу и восстановления азидогруппы до аминогруппы при одновременном деблокировании защитных групп гетероциклических оснований. На первой стадии соединения **59-63** обрабатывали  $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CBrCl}_3$ , при этом происходило замещение OH-группы на бром. Последующее замещение брома на азидогруппу проводили *in situ* путем добавления избытка  $\text{NaN}_3$ . Восстановление азидогруппы нуклеозидов **64-68** осуществляли при помощи  $\text{Ph}_3\text{P}$  в пиридине. Взаимодействие  $\text{Ph}_3\text{P}$  с  $\text{N}_3$ -группой приводит к образованию иминофосфоранов. При последующей обработке реакционной смеси конц. водн. раствором  $\text{NH}_3$  происходили гидролиз иминофосфоранов и деблокирование экзациклических аминогрупп гетероциклических оснований с образованием морфолиновых нуклеозидов **69-73**. Детритилирование морфолиновых нуклеозидов **69-73** проводили при помощи 80 % водного раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (v/v). Выход соединений **74-78** составил 40-65 %.

### 2.3.2. Синтез конъюгатов АДФ серии IIa

Серия IIa основана на 2'-аминометилморфолиновых нуклеозидах, присоединенных к  $\beta$ -фосфату АДФ через алифатическую линкерную группу, в сочетании с остатком щавелевой кислоты. Использование диметилового эфира щавелевой кислоты (DMOX) обеспечивает удобный подход для поэтапной селективной модификации соединений, содержащих алифатические аминогруппы.

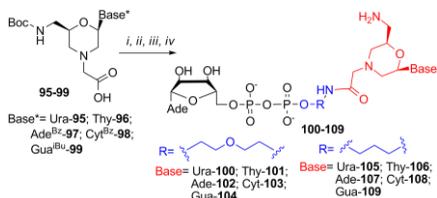
Синтез конъюгатов **81-90** проводили в две стадии (Схема 8). На первой стадии осуществляли введение остатка щавелевой кислоты по алифатической аминогруппе соединений **25, 26**. Синтез проводили путем обработки конъюгатов АДФ **25, 26** DMOX в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  в DMSO в течение 2 суток. При этом происходила полная модификация алифатической аминогруппы без затрагивания ароматических аминогрупп с количественным образованием соединений **79, 80**. На второй стадии конъюгаты АДФ **79, 80**, содержащие остаток монометилового эфира щавелевой кислоты обрабатывали 2'-аминометилморфолиновыми нуклеозидами **74-78** в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  в DMSO в течение 2 суток. Целевые конъюгаты АДФ **81-90** получены с количественным выходом. Для анализа влияния «свободного» карбоксамидного остатка, помимо конъюгатов **79, 80** получены соединения **91, 93** и **92, 94**, содержащие терминальные карбоксильную и карбоксамидную группы, соответственно.



**Схема 8.** Синтез конъюгатов АДФ серии IIa. Реагенты: (i) DMOX; (ii) **49-53**; (iii) водн. раствор NaOH или конц. водн.  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ .

### 2.3.3. Синтез конъюгатов АДФ серии IIб

Синтез соединений **100-109** осуществляли в несколько стадий (Схема 9). На первой стадии проводили активацию карбоксильной группы морфолиновых нуклеозидов **95-99** при помощи DCC и *N*-гидроксисукцинимид. Вторая стадия – реакция конденсации *N*-гидроксисукцинимидных эфиров и конъюгатов АДФ **25/26**. На третьей стадии



**Синтез 9.** Синтез конъюгатов АДФ серии IIb. Реагенты: (i) DCC, HOSu; (ii) 25/26, 1 M  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; (iii) конц. водн.  $\text{NH}_3$ ; (iv) HCOOH.

проводили удаление защитных групп по гетероциклическим основаниям морфолиновых нуклеозидов и промежуточную очистку. После удаления *N*-Вос-защитной группы получали целевые конъюгаты **100-109**.

### 3. Синтез соединений серии III

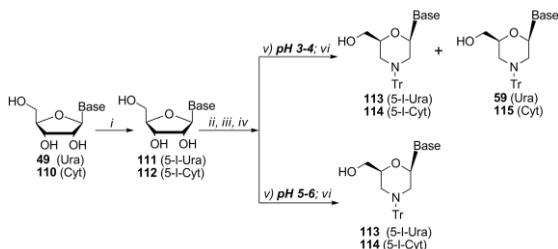
Третья серия миметиков НАД<sup>+</sup> (**III**) основана на непосредственном связывании аденозина и морфолиновых аналогов нуклеозидов через пирофосфатную связь (Рис. 1). При этом серия **III** включает в себя два типа морфолиновых нуклеозидов: 2'-гидроксиметилморфолиновые (**IIIa**) и 2'-аминометилморфолиновые (**IIIб**). Так как при тестировании соединений серии **IIIб** в ферментативной системе ПАРП I в качестве ингибиторов автополи(АДФ-рибозил)ирования наибольшую ингибирующую активность проявили соединения, содержащие остаток тимина (см. раздел **4.2**), мы решили расширить репертуар гетероциклических оснований ряда тимина/урацила в серии **III**. В случае урацильных производных мы предлагаем использование 5-галогенурацильных производных морфолиновых нуклеозидов в дополнение к природным гетероциклическим основаниям.

#### 3.1 Синтез соединений серии IIIa.

##### 3.1.1. Синтез 5-галогенпиримидиновых производных 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов

В литературе нет данных по методам синтеза 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых производных 5-галогенпиримидиновых нуклеозидов из соответствующих 5-галогенпиримидиновых рибонуклеозидов. Нам представляется, что синтез 5-галогенпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов будет более простым, если в качестве исходных соединений использовать соответствующие 5-галогенпиримидиновые рибонуклеозиды, аналогично схеме 7 при синтезе нуклеозидов **59-63**.

5-Иодуридин (**111**) и 5-иодцитидин (**112**) получены из уридина (**49**) и цитидина (**110**), соответственно, путем обработки I<sub>2</sub> в присутствии иодноватой и уксусной кислот при 40 °С в течение 2 ч (Схема 10) (*Chang et al., 1963*). Выходы 5-иодуридина (**111**) и 5-иодцитидина (**112**) после хроматографической очистки не превышали 40 и 51 %, соответственно. Низкие выходы объясняются присутствием исходных рибонуклеозидов в реакционной смеси. При



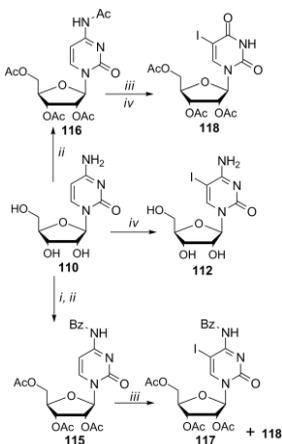
**Схема 10.** Синтез 5-иодпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) I<sub>2</sub>, HIO<sub>3</sub>, AcOH, CCl<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O; (ii) NaIO<sub>4</sub>; (iii) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·4H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N; (iv) NaCNBH<sub>3</sub>; (v) CF<sub>3</sub>COOH; (vi) TrCl, Et<sub>3</sub>N.

увеличении времени реакции мы наблюдали образование диодпроизводных (ВЭЖХ контроль). Синтез 5-иодпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов **113** и **114** проводили аналогично схеме 7 при синтезе нуклеозидов **59-63**. Наряду с соединениями **113** и **114** наблюдалось образование значительного количества дегалогенированных побочных продуктов **59** и **115**. Нами обнаружено, что процесс дегалогенирования происходит при восстановлении с помощью NaBH<sub>3</sub>CN в кислых условиях (pH 3-4), при этом целевые соединения **113** и **114** получены с выходом 25 и 18 %, соответственно, после стадии тритилирования и хроматографической очистки. Если восстановление осуществлять при pH 5-6, побочных продуктов не образуется. В этом случае соединения **113** и **114** получены

с выходом 55 и 65 %, соответственно, после стадии тритилирования без хроматографических очисток.

В связи с тем, что в процессе синтеза 5-пиримидиновых морфолиновых нуклеозидов **113** и **114** происходила реакция дегалогенирования, мы проверили устойчивость 5-иодрибонуклеозидов **111** и **112** в условиях восстановления при синтезе морфолиновых нуклеозидов в присутствии  $\text{NaCNBH}_3$  в кислых условиях (pH 3-4). В условиях реакции восстановления происходит полное деиодирование соединений **111** и **112**. Мы полагаем, что необычное поведение 5-иодуридина **111** и 5-иодцитидина **112** при взаимодействии с  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  в кислых условиях (pH 3-4) объясняется присутствием не идентифицированных неорганических примесей в 5-иодпиримидиновых нуклеозидах **111**, **112**, которые получены при использовании  $\text{I}_2$ ,  $\text{HIO}_3$ ,  $\text{AcOH}$ .

В литературе описан метод иодирования гетероциклических оснований урацильных производных, основанный на использовании церий(IV)-аммоний нитрата (CAN) в комбинации с  $\text{I}_2$  или  $\text{NaI}$  (Asakura *et al.*, 1990). Мы провели синтез 5-иодуридина **111** при использовании  $\text{I}_2/\text{CAN}$ . Несмотря на необходимость введения и удаления временных ацетильных защитных групп, общий выход 5-иодуридина (**111**) из уридина (**49**) составил 89 %.



**Схема 11.** Иодирование цитидина и его производных в присутствии CAN. Реагенты: (i) 1)  $(\text{Me})_3\text{SiCl}$ , Py, 2)  $\text{BzCl}$ , 3)  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; (ii)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py; (iii) CAN,  $\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; (iv) CAN,  $\text{NaI}$ ,  $\text{AcOH}$ .

с образованием соединения **118** в качестве единственного продукта. Иодирование незащищенного цитидина **110** в присутствии  $\text{NaI}/\text{CAN}$  в уксусной кислоте при  $80^\circ\text{C}$  было более успешным. Выход 5-иодцитидина **112** после хроматографической очистки и осаждения составил 55 %.

5-Иодцитидин **112**, полученный из цитидина **110** (Схема 11), стабилен в восстановительных условиях ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$  при pH 3-4) при синтезе морфолинового производного **114** (Схема 10). Очистку соединения **114** проводили методом осаждения. Выход соединения **114** составил 65 %.

5-Иодуридин **111**, синтезированный при использовании  $\text{I}_2/\text{CAN}$ , оказался стабильным в условиях восстановления ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$  при pH 3-4) при синтезе морфолинового производного **113** (Схема 10). Очистку соединения **113** проводили методом осаждения. Выход соединения **113** составил 56 %.

Поскольку метод иодирования при использовании  $\text{I}_2/\text{CAN}$  описан только для урацилсодержащих нуклеозидов, мы протестировали несколько способов синтеза 5-иодцитидина **112** в присутствии CAN из различных производных цитидина (Схема 11). Нами синтезированы 2',3',5'-триацетил- $N^t$ -бензоилцитидин **115** и 2',3',5'- $N^t$ -тетраацетилцитидин **116** из соответствующего цитидина (**110**) (Схема 11). Соединение **115** обрабатывали  $\text{I}_2$  и CAN при  $80^\circ\text{C}$ . Через 14 ч реакция завершилась. После разделения продуктов реакционной смеси наряду с соединением **117** мы выделили соединение **118**. В случае иодирования полностью ацетилированного цитидина **116**  $\text{I}_2/\text{CAN}$  или путем обработки  $\text{NaI}/\text{CAN}$  в уксусной кислоте при  $80^\circ\text{C}$  мы наблюдали деацетилирование и дезаминирование экзоциклической аминогруппы цитозина

Синтез 5-бром- и 5-хлорурацильных производных морфолиновых нуклеозидов **121** и **122** осуществляли из рибонуклеозидов **119**, **120** (Схема 12). Выход **121** и **122** составил 60 и 70 %, соответственно.

Таким образом, нами впервые синтезированы 5-галогенурацильные и 5-йодцитидиновые производные морфолиновых нуклеозидов из соответствующих 5-галогенпиримидиновых рибонуклеозидов. Оптимизирован метод синтеза 5-йодпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов исходя из особенностей поведения 5-йодуридина и 5-йодцитидина, полученных

различными способами, при действии NaCNBH<sub>3</sub> в кислых условиях. В дополнение к известному методу йодирования уридина в присутствии CAN, нами разработан аналогичный метод для цитидина. Предложенный нами метод синтеза 5-галогенпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов содержит меньше стадий синтеза чем опубликованные ранее, также этот метод легко масштабировать.

3.1.2. Синтез 2'-*O*-метилмонофосфорилированных производных 4'-*N*-*Tr*-морфолиновых нуклеозидов

Следующим этапом в получении пирозифосфатов динуклеозидов серии **IIIa**, являлся синтез 2'-*O*-метилмонофосфорилированных производных **123-140**. Монофосфорилирование OH-группы защищенных морфолиновых производных нуклеозидов **59-63**, **113**, **121**, **122** проводили под действием POCl<sub>3</sub> (3-4 экв.) в пиридине в течение 15 мин, при охлаждении на ледяной бане (Схема 13). По окончании реакции реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ. Целевые монофосфаты **123-130** выделяли экстракцией CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Выход монофосфатов составил 70-90 %.

3.1.3. Образование пирозифосфатной связи между АМФ и 2'-*O*-метилмонофосфорилированными производными 4'-*N*-*Tr*-морфолиновых нуклеозидов

Синтез пирозифосфатов динуклеозидов **139-146** осуществляли путем активации фосфатной группы 2'-*O*-метилмонофосфорилированных производных **123-130** с последующим взаимодействием с АМФ (Схема 14).

Реакцию активации соединений **123-130** проводили по действием Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub> в присутствии *N*-MeIm. Образовавшийся при этом *N*-метилимидазолид использовали *in situ* в реакции с АМФ. Очистку соединений **131-138** проводили методом ОФХ. Реакцию детритилирования осуществляли путем обработки соединений **131-138** 80 % водн. раствором AcOH (v/v). Общий выход пирозифосфатов **131-138** составил 70-80 %.

### 3.2 Синтез соединений серии IIIб.

Как сказано ранее, третья серия (**III**) основана на непосредственном связывании аденозина и морфолиновых нуклеозидов через пирозифосфатную связь. При этом соединения серии **IIIб** содержат в своей структуре фосфамидную связь, образованную

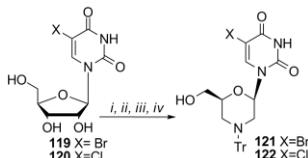
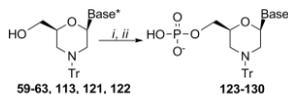


Схема 12. Синтез 5-хлор- и 5-бромурацильных морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) NaO<sub>4</sub>; (ii) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·4H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N; (iii) NaCNBH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>COOH; (iv) TrCl, Et<sub>3</sub>N.



Base\* = Ura-59, 123; Thy-60, 124; Ade<sup>Bz</sup>-61, 125; Cyt<sup>Bz</sup>-62, 126; Gua<sup>Bz</sup>-63, 127; 5-I-Ura-113, 128; 5-Br-Ura-121, 129; 5-Cl-Ura-122, 130

Схема 13. Синтез монофосфатов морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) POCl<sub>3</sub>, Py; (ii) 1 М ТЭАБ.

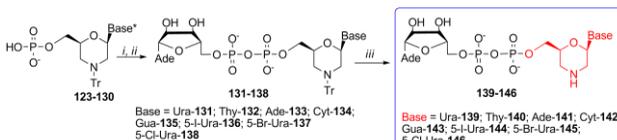


Схема 14. Синтез соединений серии **IIIa**. Реагенты: (i) Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub>, *N*-MeIm; (ii) 1) АМФ, 2) конц. водн. NH<sub>3</sub>, (iii) 80 % водн. AcOH.

между АДФ и 2'-аминометилморфолиновыми нуклеозидами (Схема 15). В качестве исходных соединений в синтезе серии **IIIб** использовали морфолиновые нуклеозиды, содержащие защитные группы по экзоциклическим

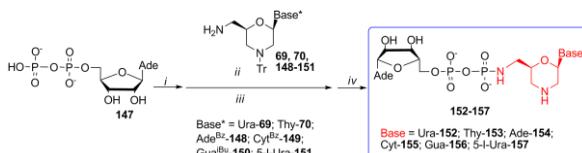


Схема 15. Синтез соединений серии **IIIб**. Реагенты: (i)  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$ , *N*-MeIm; (ii) **89, 90, 176-179**; (iii) конц. водн.  $\text{NH}_3$ ; (iv) 80 %  $\text{AcOH}$

аминогруппам гетероциклических оснований и Tr-защитную группу по морфолиновому атому азота. В случае соединений **69, 70, 151** защитные группы не требуются, поэтому синтез этих соединений осуществляли согласно схеме 7. Следует отметить, что этот подход к синтезу 2'-аминометилморфолинового нуклеозида **151** не является оптимальным, поскольку выход составил 5 %. Синтез морфолиновых нуклеозидов **148-150** проводили с некоторыми модификациями относительно схемы 7. С целью сохранения защитных групп по гетероциклическим основаниям на стадии восстановления азидогруппы до аминогруппы использовали  $\text{Ph}_3\text{P}$  в пиридине с последующей обработкой водным раствором  $\text{NaOH}$ .

Синтез конъюгатов **152-157** осуществляли путем активации концевой фосфатной группы АДФ (**147**) редокс-парой  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  в присутствии *N*-MeIm (Схема 15). Образовавшийся при этом *N*-метилимидазол АДФ использовали *in situ* в реакции с морфолиновыми нуклеозидами **69, 70, 148-151**. После деблокирования гетероциклических оснований и детритилирования в результате получены целевые пиррофосфаты **152-157**, содержащие в своей структуре фосфамидную связь.

#### 4. Ингибирование реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования ПАРП 1/2

Соединения серий **I, II** и **III** протестированы в ферментативной системе ПАРП 1 в качестве ингибиторов автополи(АДФ-рибозил)ирования. Соединения серии **III** протестированы также в ферментативной системе ПАРП 2. Работа по исследованию ингибирующих свойств соединений серий **I-III** проведена в ЛБХФ ИХБФМ СО РАН. Результаты представлены в таблицах.

##### 4.1. Серия I

Из данных Рисунка 2 видно, что единственным соединением серии **I**, проявившим ингибирующую активность в отношении ПАРП 1, оказалось соединение **30**, включающее в себя остатки 2-(2-аминоэтокси)этанола и 3-аминобензойной кислоты,  $\text{IC}_{50}$   $480 \pm 180$  мкМ. Для соединений, включающих в себя остатки никотиновой (**28** и **45**), *изо*-никотиновой (**27** и **46**), 6-гидроксиникотиновой (**29** и **48**), 3-аминобензойной (**30** и **44**) и 2-метоксибензойной (**31** и **47**) кислот показано отсутствие ингибирующей активности в отношении ПАРП 1 при укорочении линкерной группы.

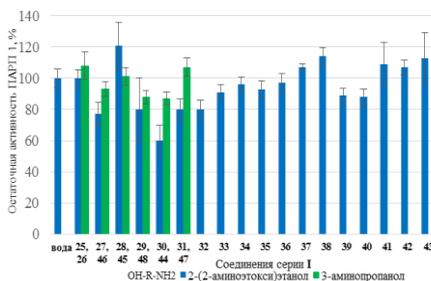


Рисунок 2. Остаточная активность ПАРП 1 в присутствии 0.5 мМ ингибиторов серии **I**.

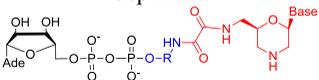
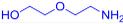
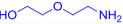
## 4.2. Серия II

Согласно данным Таблицы 1, наиболее активным соединением серии **IIa** является соединение **83** ( $IC_{50} = 123 \pm 51.0$  мкМ), включающее в себя остаток аденинсодержащего морфолинового нуклеозида, при этом показано отсутствие ингибирующей активности в отношении ПАРП 1 при укорочении линкера (соединения **83** и **88**). Стоит отметить, что урацильное производное **81** умеренно ингибирует ПАРП 1 ( $IC_{50} = 355.0 \pm 78.0$  мкМ), и, аналогично адениновым производным (соединения **83** и **88**), при укорочении линкерной группы наблюдается отсутствие ингибирующей активности в отношении ПАРП 1 (соединения **81** и **86**).

При анализе серии **IIб** показано, что наиболее активными соединениями этой серии являются соединения **101** ( $IC_{50} = 41.5 \pm 3.5$  мкМ) и **106** ( $IC_{50} = 64.0 \pm 11.0$  мкМ), включающие в себя остаток тиминсодержащего морфолинового нуклеозида (Таблица 1). Следует отметить, что при укорочении линкерной группы эффективность ингибирования ПАРП 1 несколько уменьшалась аналогично сериям **I** и **IIa**.

В отличие от соединений серии **IIa** самыми активными соединениями серии **IIб** оказались тиминсодержащие нуклеозиды. Этот факт, вероятно, связан не столько с типом азотистого основания морфолинового нуклеозида, сколько с наличием в структуре соединений серии **IIa** оксалиламидного остатка и изменением места присоединения морфолинового нуклеозида к линкерной группе.

**Таблица 1.** Ингибирующий эффект соединений серий **IIa** и **IIб** в отношении ПАРП 1.

Серия IIa				Серия IIб			
							
							
Base	IC <sub>50</sub> , мкМ	IC <sub>50</sub> , мкМ	Base	IC <sub>50</sub> , мкМ	IC <sub>50</sub> , мкМ	IC <sub>50</sub> , мкМ	IC <sub>50</sub> , мкМ
Ura <b>81</b>	<b>355.0±78.0</b>	86	Ura <b>100</b>	<b>720.0 ± 230.0</b>	105	>1000	>1000
Thy <b>82</b>	>1000	87	Thy <b>101</b>	<b>41.5 ± 3.5</b>	<b>106</b>	<b>64.0±11.0</b>	>1000
Ade <b>83</b>	<b>123.0±51.0</b>	88	Ade <b>102</b>	>1000	107	>1000	>1000
Cyt <b>84</b>	>1000	89	Cyt <b>103</b>	>1000	108	>1000	>1000
Gua <b>85</b>	>1000	90	Gua <b>104</b>	>1000	109	>1000	>1000

## 4.3. Серия III

Соединения серии **III** протестированы в ферментативной системе ПАРП 1 и ПАРП 2 в качестве ингибиторов автополи(АДФ-рибозил)ирования.

Из данных Таблицы 2 видно, что наиболее активным соединением серии **III** в отношении ПАРП 1 оказалось соединение **157** ( $IC_{50} = 126 \pm 6$  мкМ), включающее в себя остаток 5-иодурацил-2'-аминометилморфолинового нуклеозида, присоединенного к АДФ через фосфамидную связь. Его аналог, содержащий в структуре фосфодиэфирную связь, оказался приблизительно вдвое менее активным: соединение **144** ( $IC_{50} = 255 \pm 5$  мкМ). На том же уровне подавляет активность фермента тиминовое производное с фосфамидной связью в структуре: **153** ( $IC_{50} = 220 \pm 50$  мкМ). Кислородсодержащий аналог последнего, соединение **140**, подавляет активность ПАРП 1 всего на 60 % в 1 мМ концентрации. Аденинсодержащее производное **154** с фосфамидной связью в структуре также умеренно ингибирует ПАРП 1 ( $IC_{50} = 353 \pm 4$  мкМ) в отличие от кислородсодержащего аналога **141**.

При анализе ингибирующей активности соединений серии **III** в отношении ПАРП 2 видно, что самым активным соединением является соединение **154** ( $IC_{50} = 63 \pm 10$  мкМ), включающее в себя остаток аденин-2'-аминометилморфолинового нуклеозида (Таблица 2). Влияние типа связывания с молекулой АДФ на ингибирующие свойства соединений в случае ПАРП 2 более выражено, чем для ПАРП 1 (сравнение пар тимин- и аденинсодержащих производных). Исключение составляют 5-иодурацилсодержащие производные **144** и **157**, которые ингибируют ПАРП 2 одинаково независимо от типа связывания с молекулой АДФ.

**Таблица 2.** Ингибирующий эффект соединений серии **III** в отношении ПАРП 1/2

Серия <b>III</b>									
Ост. акт. ПАРП 1, %, в присутствии 1 мМ ингибиторов или $IC_{50}$ , мкМ*					Ост. акт. ПАРП 2, %, в присутствии 1 мМ ингибиторов или $IC_{50}$ , мкМ*				
Base		X=O		X=NH	Base		X=O		X=NH
Ura	139	93.0 ± 9.9 %	152	89 ± 26 %	Ura	139	67 ± 4 %	152	33 ± 5 %
<b>Thy</b>	140	40 ± 20 %	<b>153</b>	<b>220 ± 50 мкМ</b>	<b>Thy</b>	<b>140</b>	<b>474 ± 14 мкМ</b>	<b>153</b>	<b>136 ± 2 мкМ</b>
<b>Ade</b>	141	80 ± 14 %	<b>154</b>	<b>353 ± 4 мкМ</b>	<b>Ade</b>	<b>141</b>	<b>421 ± 6 мкМ</b>	<b>154</b>	<b>63 ± 10 мкМ</b>
Cyt	142	96.0 ± 2.8 %	155	87.5 ± 7.8 %	Cyt	142	66.0 ± 8.5 %	155	34.5 ± 0.7 %
Gua	143	45.5 ± 3.5 %	156	74 ± 21 %	<b>Gua</b>	143	34 ± 18 %	<b>156</b>	<b>224 ± 24 мкМ</b>
<b>5-I-Ura</b>	<b>144</b>	<b>255 ± 5 мкМ</b>	<b>157</b>	<b>126 ± 6 мкМ</b>	<b>5-I-Ura</b>	<b>144</b>	<b>160 ± 10 мкМ</b>	<b>157</b>	<b>110 ± 4 мкМ</b>
5-Br-Ura	145	36.0 ± 8.5 %			<b>5-Br-Ura</b>	<b>145</b>	<b>474 ± 71 мкМ</b>		
5-Cl-Ura	146	57.5 ± 7.8 %			5-Cl-Ura	146	46.8 ± 9.5 %		

\*Значения  $IC_{50}$  приведены для тех соединений, в присутствии которых активность ПАРП 1 не превышала 30 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен новый класс соединений в качестве потенциальных ингибиторов ПАРП 1 – производные АДФ, модифицированные по  $\beta$ -фосфату. Предлагаемые нами соединения являются миметиками НАД<sup>+</sup>, их отличительной особенностью от уже существующих ингибиторов ПАРП является наличие в структуре двух значимых структурных элементов молекулы НАД<sup>+</sup> – аденозинового и пирофосфатного фрагментов. В качестве никотинамидрибозидного фрагмента нами предложено использование остатков различных ароматических карбоновых кислот и трех типов морфолиновых аналогов нуклеозидов. При этом присоединение этих аналогов к молекуле АДФ осуществлено как через алифатическую линкерную группу, так и напрямую.

В рамках работы по созданию библиотеки миметиков НАД<sup>+</sup> оптимизирован метод образования пирофосфатной связи для синтеза нуклеозид-5'-дифосфатов, содержащих линкерную группу по концевому фосфату, и пирофосфатов динуклеозидов. Мы полагаем, что применение этого метода возможно расширить для образования полифосфатных производных нуклеозидов и их аналогов. Разработан универсальный подход к синтезу двух серий производных АДФ, основанный на использовании общего соединения-предшественника – функционализированного конъюгата АДФ. Использование прекурсорного подхода к созданию библиотеки позволило синтезировать большое количество соединений.

Усовершенствован протокол получения морфолиновых нуклеозидов из соответствующих рибонуклеозидов, что привело к решению задачи масштабирования их синтеза без использования хроматографических очисток. Впервые получены 5-галогенпиримидиновые морфолиновые нуклеозиды из соответствующих 5-галогенпиримидиновых рибонуклеозидов. Разработка метода синтеза 5-галогенпиримидиновых морфолиновых нуклеозидов дает возможность увеличить структурное многообразие морфолиновых нуклеозидов, а вследствие этого и область их применения.

По результатам тестирования предложенных нами миметиков НАД<sup>+</sup> в ферментативной системе ПАРП 1 обнаружено, что эти соединения являются умеренными ингибиторами ПАРП 1 ( $IC_{50}$  40-474 мкМ). Автор диссертационной работы полагает, что предложенный в результате исследования класс соединений может служить новой платформой для создания эффективных ингибиторов ферментов семейства ПАРП и в дальнейшем найти свое применение в качестве терапевтических агентов.

## ВЫВОДЫ

1. Осуществлен дизайн и синтез трех серий ингибиторов ПАРП 1, имитирующих субстрат ПАРП 1 НАД<sup>+</sup>. Первая и вторая серии миметиков НАД<sup>+</sup> содержат производные ароматических карбоновых кислот и морфолиновые аналоги нуклеозидов, присоединенные к концевому фосфату АДФ через алифатическую линкерную группу. Третья серия основана на непосредственном присоединении морфолиновых аналогов нуклеозидов к молекуле АДФ через фосфоэфирную или фосфамидную связи. Предложенные соединения являются умеренными ингибиторами ПАРП 1 (IC<sub>50</sub> 40-474 мкМ).
2. Разработан универсальный подход к получению серий **I** и **II**, основанный на использовании общего соединения-предшественника – функционализированного конъюгата АДФ. Выявлены основные параметры, влияющие на выходы целевых соединений при синтезе морфолиновых аналогов нуклеозидов:
  - тщательный контроль pH в диапазоне 8.5-9 на стадии образования основания Шиффа;
  - использование I<sub>2</sub>/NaI в присутствии нитрата церия(VI)-аммония для получения 5-иодпиримидиновых рибонуклеозидов.
3. Определены общие структурные закономерности предложенных соединений, влияющие на ингибирующий эффект в отношении ПАРП 1:
  - увеличение длины линкерной группы оказывает положительное влияние на ингибирующую активность соединений серии **I** и **II**;
  - включение в структуру линкерной группы оксалиламидного остатка и изменение места присоединения морфолинового нуклеозида к молекуле АДФ существенно изменяет ингибирующую активность соединений серии **II**;
  - изменение типа связывания морфолинового нуклеозида с молекулой АДФ с фосфоэфирной на фосфамидную связь и введение атома иода по 5-ому положению урацилсодержащего морфолинового нуклеозида в значительной степени повышает ингибирующую активность соединений серии **III**.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:**

1. **Sherstyuk Y.V.**, Abramova T.V. How to form a phosphate anhydride linkage in nucleotide derivatives // ChemBioChem. – 2015. – V. 16. – P. 2562-2570.
2. **Tarasenko Y.V.**, Abramova T.V., Mamatuk V. I., Silnikov V.N. Effective synthesis of fluorescently labeled morpholino nucleoside triphosphate derivatives // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2016. – V. 35. – 32-42.
3. **Щерстюк Ю.В.**, Захаренко А.Л., Кутузов М.М., Суханова М.В., Лаврик О.И., Сильников В.Н., Абрамова Т.В. Синтез серии аналогов NAD<sup>+</sup> – потенциальных ингибиторов ПАРП 1 – с использованием конъюгатов ADP, функционализированных по концевой фосфатной группе // Биоорган. химия. – 2017. – Т. 43. – С. 88-96.
4. **Sherstyuk Y.V.**, Zakharenko A.L., Kutuzov M.M., Chalova P.V., Sukhanova M.V., Lavrik O.I., Silnikov V.N., Abramova T.V. A versatile strategy for the design and synthesis of novel ADP conjugates and their evaluation as potential poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitors // Molec. Divers. – 2017. – V. 21. – P. 101-113.