РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ШЕРСТЮК ЮЛИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО β-ФОСФАТУ ПРОИЗВОДНЫХ АДФ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1

02.00.10 - биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук,

Абрамова Татьяна Вениаминовна

Новосибирск – 2018

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ5
ВВЕДЕНИЕ7
ГЛАВА 1. ИНГИБИТОРЫ ПАРП, ОДОБРЕННЫЕ ИЛИ ИСПЫТЫВАЕМЫЕ
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР
ЛИТЕРАТУРЫ)
1.1. Соединения, содержащие первичную амидную группу 15
1.2. Бициклические лактамсодержащие соединения
1.3. Полициклические лактамсодержащие соединения
ГЛАВА 2. ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ОБРАЗОВАНИЯ
ПИРОФОСФАТНОЙ СВЯЗИ В НУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)
2.1. Использование соединений, содержащих P-Cl связь
2.2. Использование <i>Н</i> -фосфонатов
2.3. Использование соединений, содержащих P-N связь
2.3.1. Фосфоимидазолиды и фосфо(<i>N</i> -метил)имидазолиды
2.3.2. Фосфоморфолиды и фосфопиперидиды 40
2.3.3. Амидофосфиты
2.4. Карбодиимиды в реакции образования пирофосфатной связи
2.5. Заключение
ГЛАВА 3. ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО β-ФОСФАТУ
ПРОИЗВОДНЫХ АДФ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПАРП 1
(РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)
3.1. Оптимизация метода образования пирофосфатной связи в фосфатных
производных нуклеозидов
3.1.1. Способ 1. Образование активированного производного фосфата из
нуклеозида
3.1.2. Способ 2. Образование активированного производного фосфата путем
активации 5'-монофосфата нуклеозида 59

4.2.1. Общая методика образования пирофосфатной связи в фосфатных
производных нуклеозидов напримере синтеза 5',5'-пирофосфата аденозина и
3'-азидотимидина
4.2.2. Синтез конъюгатов АДФ с аминолинкером 108
4.2.3. Синтез конъюгатов АДФ серии I 114
4.2.4. Синтез 2'-гидроксиметилморфолиновых аналогов нуклеозидов 118
4.2.5. Синтез конъюгатов АДФ серии Па 120
4.2.6. Синтез конъюгатов АДФ серии Пб 124
4.2.7. Синтез 5-галогенпиримидиновых производных морфолиновых
нуклеозидов 128
4.2.8. Синтез монофосфатов 4'- <i>N</i> -Tr-морфолиновых нуклеозидов 133
4.2.9. Синтез производных АДФ серии Ша 136
4.2.10. Синтез производных АДФ серии Шб 139
ВЫВОДЫ142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– 5'-дифосфат аденозина
ΑΜΦ	– 5'-монофосфат аденозина
ATΦ	– 5'-трифосфат аденозина
AOX	– анионообменная хроматография
ВЭЖХ	 высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМФ	– 5'-монофосфат инозина
НАД+	– никотинамидадениндинуклеотид
ОФХ	– обращенно-фазовая хроматография
ПАРП	 – поли(АДФ-рибоза)полимераза
РНК	– рибонуклеиновая кислота
TCX	 тонкослойная хроматография
ТЭАБ	– бикарбонат триэтиламмония
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
AcOH	– уксусная кислота
Ac_2O	– ангидрид уксусной кислоты
Ade	– аденин
Boc	<i>– трет-</i> бутилоксикарбонил
BSA	- <i>N,О</i> -бис-триметилсилилацетамид
Bz	– бензоил
BzC1	– хлористый бензоил
<i>i</i> Bu	– изобутирил
CAN	– нитрат церия(IV)-аммония
CDI	<i>– N,N'</i> -карбонилдимидазол
Cyt	— ЦИТОЗИН
DBU	– 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
DCC	 – N,N'-дициклогексилкарбодиимид

DIC	– <i>N,N'</i> -диизопропилкарбодиимид
DMC	– хлорид 1,3-диметил-2-хлоримидазолия
DMF	– диметилформамид
DMI	– 1,3-диметил-2-имидазолидинон
DMOX	– диметиловый эфир щавелевой кислоты
DMSO	– диметилсульфоксид
EDC	– 3-(3-диметиламинопропил)-1-этилкарбодиимид
FDA	– агентство Министерства здравоохранения и
	социальных служб США
FmocCl	– 9-флуоренилметилоксикарбонилхлорид
Gua	– гуанин
HOSu	<i>– N</i> -гидроксисукцинимид
Im	— имидазол
<i>N</i> -MeIm	- <i>N</i> -метилимидазол
MesCl	– 2-мезитиленсульфонилхлорид
MMTrCl	– 4'-монометоксифенилдифенилметилхлорид
Ру	– пиридин
$(PyS)_2$	– 2,2'-дипиридилдисульфид
TBDPS	<i>– трет</i> -бутилдифенилсилил
Thy	— ТИМИН
TFA	– трифторацетил
TFAA	– трифторуксусная кислота
TfO	– трифторметансульфонат
TMSCl	– триметилсилилхлорид
TrCl	– трифенилметилхлорид

Ura – урацил

ВВЕДЕНИЕ

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 [1-3]. Участие ПАРП в передаче сигнала и репарации повреждений 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 [4]. В настоящее время основное внимание применению ингибиторов ПАРП уделяется в онкологии, о чем свидетельствует ряд доклинических и клинических данных, полученных в этой области [5].

ПАРП 1 – самый изученный член семейства ферментов ПАРП [6]. ПАРП 1, также как и другие члены семейства ПАРП, использует никотинамидадениндинуклеотид (НАД+) в качестве субстрата для моно- и поли(АДФ-рибозил)ирования белков-акцепторов, в том числе самого ПАРП 1 [7]. Одним из структурных элементов НАД+ и основным побочным продуктом реакции (АДФ-рибозил)ирования является никотинамид. Никотинамид ингибирует ПАРП 1 [8], и на его основе разработана основная часть существующих ингибиторов ПАРП, в том числе одобренных FDA [9]. 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 [10-13]. Однако фармацевтическое использование существующих ингибиторов ПАРП до сих пор ограничено по ряду причин: наличие побочных эффектов, развитие резистентности опухолей к игибиторам ПАРП; разная эффективность в комбинации с традиционными химиопрепаратами [5, 14]. 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+. Молекула НАД+ представляет собой пирофосфат динуклеозида и состоит из трех структурных элементов: никотинамидрибозида, аденозина и пирофосфатного фрагмента. В литературе нет данных по исследованию миметиков НАД+ в качестве ингибиторов ПАРП. В тоже время структурные аналоги НАД+, 5',5'-пирофосфаты динуклеозидов широко используются в поиске ингибиторов НАД-зависимых ферментов: ИМФ-дегидрогеназы [15-17], НАД+-киназы [18], бактериальной ДНК-лигазы [19], и CD38/НАД+-гликогидролазы [20]. Также стоит отметить, что на основе полифосфатов динуклеозидов разработаны лекарственные препараты для лечения синдрома сухого глаза [21] и кистозного фиброза [22].

Природные и модифицированные нуклеозиды и их фосфорилированные производные являются незаменимыми инструментами для поиска новых противораковых, противовирусных и противобактериальных лекарственных препаратов [23, 24]. Однако в литературе приведено малое количество работ по исследованию нуклеозидных производных в качестве ингибиторов ПАРП, хотя некоторые из них проявляют умеренную ингибирующую активность в ПАРП 1. Так, при исследовании ингибирующих свойств отношении 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 [25]. Исследования 5',5'-полифосфатов диаденозина (Ар_nA,

n=2-6) в качестве ингибиторов реакции АДФ-рибозилирования гистона H1 показали, что при увеличении числа фосфатных групп Ар_nA (с 2 до 4) происходит снижение остаточной активности ПАРП [26]. 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 [27]. В литературе известны ингибиторы ПАРП 1 на основе производных изоиндолинона, аналога никотинамида, основе конъюгатов И на 5'-положению изоиндолинона, присоединенного ПО аденозина через различные спейсеры [28]. 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 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 66 производных аденозин-5'-дифосфата, ИЗ новых модифицированных по β-фосфату, имитирующих субстрат ПАРП 1 НАД+. Оптимизирован метод образования пирофосфатной связи в нуклеозидных производных. Усовершенствован протокол получения морфолиновых нуклеозидов из соответствующих рибонуклеозидов. Впервые получены 5галогенурацилморфолиновые нуклеозиды соответствующих ИЗ 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 1 НАД+. Первая серия миметиков НАД+ (I) содержит производные ароматических карбоновых кислот, присоединенные 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 (**II6**). Третья серия миметиков НАД+ (**III**) основана на непосредственном связывании аденозина и двух типов морфолиновых нуклеозидов – 2'-гидроксиметилморфолиновых (**IIIa**) и 2'аминометилморфолиновых (**III6**) – через пирофосфатную связь

2. Разработан универсальный подход к получению серий I и II, основанный на использовании общего соединения-предшественника – функционализированного 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. *N*-защитной 0-Наиболее подходящей группой в условиях 9монофосфорилирования аминоспиртов является флуоренилметоксикарбонильная группа В сравнении с тритильной, монометокситритильной и трифторацетильной.

3. Впервые получены морфолиновые нуклеозиды, содержащие 5галогенурацил 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 I₂/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 1, IC₅₀ 40-474 мкМ. Наиболее эффективным ингибитором ПАРП 1 является конъюгат АДФ, содержащий остатки 2-(2-аминоэтокси)этанола и 2'-аминометил-4'карбоксиметил-6'-(тимин-1-ил)морфолинового нуклеозида, IC₅₀ 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 фосфоэфирной 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 апробации 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).

Личный вклад автора

Автором лично выполнен весь объем экспериментальной работы по синтезу библиотеки миметиков НАД+. Автор внес основной вклад в разработку дизайна структур миметиков НАД+, разработку схем синтеза миметиков НАД+, обсуждение результатов исследований и написание статей.

Структура и объем диссертации

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.

ГЛАВА 1. ИНГИБИТОРЫ ПАРП, ОДОБРЕННЫЕ ИЛИ ИСПЫТЫВАЕМЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Суперсемейство поли(АДФ-рибоза)полимераз (ПАРП) содержит, по крайней мере, 17 ферментов и играет значительную роль в многочисленных ДНК, биологических процессах, включая репарацию регуляцию транскрипции, регуляцию клеточного цикла, воспаление, реакцию на гипоксию и гибель клеток [1-3]. Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (ПАРП 1) является наиболее распространенным и изученным ферментом семейства ПАРП [29]. ПАРП 1 катализирует ковалентное присоединение АДФрибозильных остатков на белки-акцепторы, такие как гистоны, белки репарации ДНК, транскрипционные факторы, модуляторы хроматина и сам ПАРП 1, используя НАД+ (1.1) в качестве донора АДФ-рибозильных остатков с образованием моно- или поли(АДФ-рибозил)ированных продуктов 1.2 (Рис. 1.1) [29-31].



Рисунок 1.1. Моно(АДФ-рибозил)ирование.

Учитывая роль ферментов ПАРП в репарации ДНК и их повышенную экспрессию во многих раковых клетках, ферменты этого семейства широко используются в качестве мишеней в противораковой терапии [32-38].

Большинство ингибиторов ПАРП, изученных на сегодняшний день, представляют собой аналоги никотинамида (**1.3**), содержащие такие фармакофоры как карбоксамид или лактам. Все они являются конкурентными или смешанными ингибиторами [9]. В 80х годах отправной точкой в поиске ингибиторов ПАРП стали два соединения: никотинамид (**1.3**, IC₅₀ = 210 мкМ) и 3-аминобензамид (**1.4**, $K_i = 1.8$ мкМ, IC₅₀ = 30 мкМ) (Рис. 1.2) [39].



Рисунок 1.2. Структура никотинамида и 3-аминобензамида.

1.1. Соединения, содержащие первичную амидную группу

Поскольку никотинамид (1.3) обладает умеренной ингибирующей активностью в отношении ПАРП 1, ингибиторы первого поколения являются близкими аналогами никотинамида, в структуре которых пиридиновое кольцо никотинамида замещено бензольным кольцом, что привело к повышению эффективности ингибирования. Первым известным конкурентным ингибитором ПАРП 1 является 3-аминобензамид (1.4, $K_i = 1.8$ мкМ), синтезированный путем каталитического гидрирования 3-нитробензамида [39]. С использованием 3-аминобензамида доказано, что одной из функций ПАРП является участие в восстановлении клеток после повреждения ДНК [40].

При исследовании влияния различных заместителей в бензольном кольце соединения **1.4**, обнаружено, что сравнительно высокой активностью ($IC_{50} = 240$ нМ) обладает соединение **1.5**, содержащее в своей структуре имидазольный цикл (Рис. 1.3). Бензимидазольное карбоксамидное ядро

соединения **1.5**, вследствие малого размера при сравнительно высокой активности, представляет собой удобную платформу для разработки новых высокоэффективных соединений. На его основе разработано несколько сотен 2-алкиламинопроизводных [41, 42]. Лучшие результаты по ингибированию ПАРП 1 показали соединения **1.6** ($K_i = 7$ нМ) [43] и **1.7** ($K_i = 8$ нМ) [41] (Рис.1.3). Показано, что наличие четвертичного атома углерода вблизи бензимидазольного кольца необходимо для увеличения ингибирующей активности на ферментативном и клеточном уровнях. Позднее этой же группой ученых получено еще более эффективное соединение **1.8** (Рис. 1.3) [44, 45].



Рисунок 1.3. Велипариб и его соединения-предшественники.

В настоящее время соединение **1.8** известно как Велипариб (АВТ-888). Велипариб (**1.8**) проявляет ингибирующее действие как в отношении ПАРП 1 ($K_i = 5.2 \text{ hM}$), так и в отношении ПАРП 2 ($K_i = 2.9 \text{ hM}$) [44]. По результатам доклинических испытаний показано, что Велипариб повышает чувствительность опухолевых клеток к общей антираковой терапии, радиотерапии и воздействию ДНК-алкилирующих агентов [46]. В некоторых случаях использование соединения **1.8** привело к снижению устойчивости опухолей по отношению к химиотерапии [47].

В качестве ингибиторов ПАРП предложена серия бензкарбоксамидов, содержащих в своей структуре 5-членный гетероцикл, аннелированный с бензольным кольцом, соединения **1.9-1.12**, IC₅₀ = 71, 24, 55 и 270 нМ соответственно (Рис. 1.4) [48]. Исследование влияния заместителей по бензольному кольцу в соединении **1.10** показало, что самым перспективным является соединение **1.13** (IC₅₀ = 3.8 нМ) [48]. Соединение **1.13**, известное как Нирапариб, является ингибитором ПАРП 1 и 2 с IC₅₀ = 3.8 и 2.1 нМ, соответственно [48].

Нирапариб (1.13) является структурным аналогом Велипариба (1.8), однако обладает лучшими характеристиками действия на уровне клеточных культур, большей селективностью в отношении раковых клеток по сравнению с нормальными и повышенной ингибирующей способностью в отношении ПАРП [49]. Это соединение повышает чувствительность раковых клеток человека к радио- и химиотерапии [50-52]. В марте 2017 года Нирапариб одобрен FDA в качестве поддерживающей терапии взрослых пациентов с рецидивирующим эпителиальным раком яичников, раком фаллопиевой трубы или первичным перитонеальным раком, которые полностью или частично реагируют на химиотерапию на основе соединений платины. Препарат используют в форме соли *n*-толуолсульфоновой кислоты. В настоящее время Нирапариб (1.13) тестируют в клинических испытаниях III фазы в качестве поддерживающей терапии пациентов с раком яичников на стадии III или IV, чувствительных к соединениям платины (NCT02655016) и пациентов с прогрессирующим/метастатическим раком молочной железы (NCT01905592).



Рисунок 1.4. Структура Нирапариба и его предшественников.

1.2. Бициклические лактамсодержащие соединения

В попытке улучшить свойства ингибиторов ПАРП 1 первого поколения, на основе никотинамида (1.3) и 3-аминобензамида (1.4), ученые из университета Киото провели скрининг более 100 соединений из нескольких структурных классов, в том числе бициклических и трициклических лактамов (1.14-1.19) в качестве ингибиторов ПАРП 1 (Рис. 1.5) [53-55].



Рисунок 1.5. Бициклические и трициклические лактамсодержащие соединения.

В период с 2000 по 2003 гг. получены ряд патентов на применение 3- и 4-замещенных изохинолинонов (1.14) [56], 4-замещенных фталазинонов (1.17) [57] и 2-замещенных хиназолинонов (1.18) [58] в качестве ингибиторов ПАРП 1. Перспективные результаты ингибирования в отношении ПАРП 1 имело соединение 1.20 (Рис. 1.6), 4-бензилзамещенное производное фталазинона, $IC_{50} = 770$ нМ [59, 60]. Путем добавления заместителей по 3- и 4положениям бензильного кольца в соединении 1.20 было достигнуто повышение эффективности ингибирующей активности. Результаты скрининга показали, что наличие атома фтора и имидной группы (соединение 1.21) способствуют увеличению ингибирующей активности ($IC_{50} = 5$ нМ) и повышению устойчивости к инактивации в процессе метаболизма [59].

Одной из главных «лекарственных» характеристик является пероральная биодоступность. Попытки улучшить характеристики соединения **1.21** в этом отношении привели к созданию соединения **1.22** [61]. Диацилпиперазиновый фрагмент обеспечивает повышение ингибирующей активности в отношении ПАРП (IC₅₀ = 5 нМ), а циклопропильная группа обеспечивает пероральную биодоступность [61]. Олапариб (AZD2281), соединение **1.22**, является ингибитором ПАРП 1 и 2, IC₅₀ = 5 и 1 нМ, соответственно [62].



Рисунок 1.6. Структура Олапариба.

С 2013 г. проведено более 60 клинических исследований действия Олапариба (1.22) как самостоятельного препарата, так и в комбинации с другими препаратами с обнадеживающими результатами [63-65]. В 2014 году Олапариб одобрен в качестве поддерживающей терапии у пациентов с раком яичников с мутациями в генах *BRCA1/2* после химиотерапии на основе соединений платины. У некоторых пациентов, несмотря на хорошую переносимость монотерапии Олапарибом, лечение им было прекращено в связи с прогрессированием опухоли вследствие возникающей резистентности опухоли к Олапарибу [66].

На основе Олапариба (1.22) разработан ингибитор ПАРП следующего поколения, соединение 1.23, AZD2461 (Рис. 1.7) [67]. Соединение 1.23 сохраняет тот же уровень активности против раковых клеток, IC₅₀ (ПАРП 1) = 5 нМ и IC₅₀ (ПАРП 2) = 2 нМ, но отличается от Олапариба (1.22) чувствительностью к механизмам лекарственной устойчивости [14, 68]. В 2010 г. в рамках клинического испытания I фазы проведено тестирование лекарственного препарата AZD2461 (1.23) на солидных опухолях с целью исследования безопасности и переносимости препарата (NCT01247168). Однако в 2011 г. исследования были прекращены [69].



Рисунок 1.7. Аналог Олапариба, AZD2461.

1.3. Полициклические лактамсодержащие соединения

Полициклические лактамсодержащие препараты разработаны на основе карбоксамида бензимидазола (1.5). Поскольку в структуре соединения 1.5 присутствует внутримолекулярная водородная связь (Рис. 1.8), создано несколько серий соединений, в структуре которых вместо водородной связи используют шести- или семичленные кольца. В результате работы над структурой соединения с целью улучшения биологической активности исследований. выявлено несколько кандидатов для клинических Исследования влияния заместителей по фенильному кольцу в соединении 1.24 показали, что хорошей ингибирующей активностью в отношении ПАРП обладают соединения либо без заместителей, соединение **1.24** (X=H, $K_i = 4.1$ нМ), либо с заместителями по 4-ому положению, соединения 1.24 (X=-CH₂-ОН $K_i = 4.2$ нМ, **X**=-CH₂-N(CH₃)₂ $K_i = 5.8$ нМ) (Рис. 1.8) [70].

Соединения, содержащие в своей структуре вместо бензимидазольного кольца индольное кольцо (соединения **1.25** и **1.26**), также проявляют ингибирующую активность по отношению к ПАРП 1. При этом в случае отсутствия заместителей по фенильному кольцу в соединениях **1.25** и **1.26** особое влияние оказывает положение атома азота в индольном кольце, **1.25** (Y=H, $K_i = 14.3$ HM) и **1.26** (Z=H, $K_i = 6$ HM) [71, 72].



Рисунок 1.8. Рукапариб и его соединения-предшественники.

Исследования влияния заместителей по фенильному кольцу в соединениях **1.25** и **1.26** показали, что хорошей ингибирующей активностью обладают соединения с заместителями по 4-положению: соединение **1.25** Y= - CH₂-NH(CH₃) K_i=3.8 нM, Y=-CH₂-N(CH₃)₂ K_i=6.4 нM, соединение **1.26** Z= -- CH₂-N(CH₃)₂ K_i=5 нM, (Рис. 1.8) [71, 72].

На основе полученных результатов был разработан препарат Рукапариб, соединение **1.27** (Рис. 1.8) [73]. Рукапариб является ингибитором ПАРП 1, 2 и 3, IC₅₀ = 0.8, 0.5 и 28 нМ соответственно [74, 75]. В 2003 г. Рукапариб был

~ 22 ~

первым ингибитором ПАРП, участвовавшим в клинических испытаниях. Он проявлял активность против рака яичников как *in vitro*, так и *in vivo* [76]. Комбинированная терапия Рукапарибом (**1.27**) с темолозомидом и 4фторурацилом усиливает действие химиотерапии при лечении метастатической меланомы [77] и острого лейкоза [78]. В 2016 г. Рукапариб (**1.27**) одобрен FDA для лечения пациентов с неблагоприятными мутациями в генах *BRCA1/2*, связанными с прогрессирующим раком яичника [79].

B ингибиторов ΠΑΡΠ качестве предложены дигидропиридофталазиноны общей формулой 1.28 (Рис. 1.9) [80]. На основе этого класса соединений в 2011 г. разработан структурный аналог Олапариба (**1.22**, Рис. 1.6), соединение **1.28** (Рис. 1.9) [11, 80]. Талазопариб (BMN-673), соединение **1.28**, ингибирует ПАРП 1 и 2, $K_i = 1.2$ и 0.87 нМ, соответственно [11]. Талазопариб (1.28) демонстрирует бо́льшую цитотоксичность, чем другие клинические ингибиторы ПАРП, в сочетании с ДНК-алкилирующими агентами [81, 82]. Показана активность данного препарата при монотерапии пациентов с мелкоклеточным раком легких [83]. В настоящее время Талазопариб (1.28) находится на III стадии клинических испытаний для использования в качестве монотерапии пациентов с BRCA-дефицитным раком молочной железы (NCT01945775).



Рисунок 1.9. Структура Талазопариба.

На протяжении трех десятилетий ингибиторы ПАРП создавались как аналоги никотинамида (1.3), потенциально действующие в качестве конкурентных ингибиторов, ингибируя каталитический центр фермента. Однако последние исследования показали, что в дополнение к ингибированию ингибиторы ПАРП способны катализа, некоторые индуцировать аллостерическое конформационное изменение ПАРП 1/2, стабилизируя их связь с ДНК и образуя комплекс «ПАРП 1/2-ДНК-ингибитор» [49, 81]. Комплекс препятствует репликации ДНК и транскрипции, тем самым убивая раковую клетку более эффективно, чем каталитическое ингибирование. При исследовании эффективности образования комплекса «ПАРП 1/2-ДНКингибитор» пяти ингибиторов ПАРП, одобренных для применения в клинической практике или проходящих клинические испытания (Рис. 1.10), обнаружено, что способность этих ингибиторов к образованию комплекса не коррелирует с данными ингибирования катализа ПАРП, однако согласуется с данными по цитотоксичности этих соединений [49, 81, 84].



Рисунок 1.10. Ингибиторы ПАРП, образующие комплекс «ПАРП 1/2–ДНК– ингибитор».

Ингибиторы ПАРП (Рис. 1.10) распределяются по их способности образовывать комплекс «ПАРП 1/2–ДНК–ингибитор» следующим образом

(от самого эффективного к наименее эффективному) Талазопариб (1.29) > Нирапариб (1.13) > Олапариб (1.22) = Рукапариб (1.27) >> Велипариб (1.8) [85]. Велипариб (1.8) является неактивным в большинстве линий раковых клеток при концентрации 100 мкМ, и напротив, Талазопариб (1.29) является весьма активным при наномолярной концентрации [49, 81].

Способность клинических ингибиторов ПАРП индуцировать аллостерическое конформационное изменение ПАРП 1/2, возможно, связана со структурными особенностями каждого из них, общими размерами и гибкостью молекул [85]. Самым маленьким соединением является Велипариб (**1.8**, M_r = 244), он же проявляет самую низкую активность в образовании комплекса. Однако, Талазопариб (**1.29**), несмотря на свои небольшие размеры относительно Олапариба (**1.22**), проявляет наибольшую активность в отношении конформационных изменений ПАРП 1/2. Возможно это связано с «жесткостью» структуры и её стереоспецифичностью [81, 86].

ГЛАВА 2. ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПИРОФОСФАТНОЙ СВЯЗИ В НУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Природные и модифицированные 5'-нуклеозидтрифосфаты являются незаменимыми субстратами для огромного количества методов в современных биологических исследованиях, начиная от полимеразной цепной реакции до мечения ДНК/РНК, неспецифического мутагенеза и ДНКсеквенирования [87].

Динуклеозид-5',5'-полифосфаты ((Np_nN) являются важными внутри- и внеклеточными сигнальными молекулами, которые принимают участие в регуляции многих биологических процессов [88, 89]. Динуклеозид-5',5'полифосфаты участвуют в регуляции кровяного давления [90], уровней инсулина и глюкозы в крови [91], в реакции клеток на стресс [92], при тромбоцитов [93] и передаче активации нервных импульсов [94]. Динуклеозид-5',5'-полифосфаты являются предметом поиска новых лекарственных средств; в настоящее время некоторые из полифосфатов фармацевтическими [95-98]. динуклеозидов являются препаратами Соединение Up₄U используется для лечения синдрома сухого глаза [21]. Соединение dCp₄U применяется для лечения кистозного фиброза [22]. Исследовано влияние полифосфатов диинозина на внутриглазное давление [99]. Установлено, что Up₄A играет важную роль в сосудистой дисфункции, связанной с диабетом и артериальной гипертензией [100].

Для решения фундаментальных проблем в области биологии РНК весьма успешным является создание библиотеки Np₃N' В качестве структурных аналогов кэпированных РНК [101]. На структуре полифосфатов динуклеозидов основаны разработки потенциальных ингибиторов НАДкиназы [102], ИМФ-дегидрогеназы [103], НАД+-нуклеозидазы [20] и НАД+ синтетических аналогов как редокс системы [104, 105]. Нуклеозидполифосфаты и их конъюгаты играют фундаментальную роль в

живых системах. Именно поэтому много усилий сосредоточено на разработке общего и практичного метода синтеза этих соединений [106-111].

2.1. Использование соединений, содержащих P-Cl связь

Выдающимся научным достижением в области селективного монофосфорилирования природных нуклеозидов является использование хлорокиси фосфора (V) в триалкилфосфате [112]. Выходы монофосфатов варьируются от 88 до 98 %. Региоселективность реакции объясняется образованием комплекса нуклеозид-триалкилфосфат: триалкил фосфат взаимодействует с 5'-гидроксильной группой и с самым нуклеофильным атомом азота гетероциклического основания (Рис. 2.1) [113].



Рисунок 2.1. Комплекс нуклеозид-триалкилфосфат [113].

На основе этого метода монофосфорилирования нуклеозидов разработан малостадийный и удобный метод синтеза природных и модифицированных нуклеозидтрифосфатов: "one pot, three steps" (Схема 2.1) [114, 115]. На первой стадии незащищенный нуклеозид (2.1) подвергают обработке POCl₃ в триалкилфосфате, при этом образуется производное 2.2. Дихлорфосфат 2.2 является высоко реакционноспособным соединением, которое при взаимодействии *in situ* с неорганическим пирофосфатом образует циклический триметафосфат 2.3. При последующем гидролизе соединения 2.3 происходит образование 5'-нуклеозидтрифосфата 2.4.

~ 28 ~



Схема 2.1. Общая схема синтеза природных нуклеозид-5'-трифосфатов "one pot, three step" по методу [114].

На основе стратегии "one pot, three steps" [114] (Схема 2.1) разработан 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-тетрафосфатов метод получения [116]. Использование трифосфата вместо неорганического пирофосфата в реакции с 5'-дихлорфосфатом 2'-дезоксирибонуклеозида 2.2 приводит к образованию 2'дезоксирибо-5'-нуклеозидтетрафосфатов с выходом 40-48 %. Низкие выходы 5'-тетрафосфатов по сравнению с 5'-нуклеозидтрифосфатами можно объяснить использованием меньших (стехиометрических) количеств неорганического трифосфата на второй стадии синтеза, в отличие от протокола Ludwig [114], в котором применяется 2-3-кратный избыток неорганического пирофосфата. Использование стехиометрических количеств трифосфата неорганического может приводить к неполному тетрафосфорилированию исходного нуклеозида, однако облегчает очистку целевого тетрафосфата от неорганических примесей.

Возможность применения незащищенных нуклеозидов является самым важным преимуществом данного подхода, что сделало его весьма распространённым при синтезе природных нуклеозид-5'-трифосфатов с хорошим выходом (60-85 %). Однако выход целевого продукта в значительной степени зависит от природы нуклеозида и от чистоты исходных растворителей и реагентов. Синтез модифицированных по гетероциклическому основанию и/или углеводному фрагменту нуклеозид-5'-ди-, три- и тетрафосфатов протекает с гораздо более низкими выходами 5.5-58 % [108, 117, 118].

Трифосфорилирование 5'-гидроксильной группы протекает с большим выходом (80-90 %) при использовании в качестве исходных соединений защищенных нуклеозидов или динуклеотидов [119, 120]. Очистку целевых трифосфатов в этом случае проводят в два этапа: до удаления защитных групп применяют обращенно-фазовую хроматографию, а после – анионообменную. Данный подход обеспечивает полную очистку от неорганических примесей.

Использование более активных соединений Р(III), содержащих Р-Сl связь (например, 2-хлор-4*H*-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-он (**2.5**), Схема 2.2) требует введения защитных групп по гидроксильным группам углеводного фрагмента, не участвующих в реакции, и по экзоциклическимаминогруппам гетероциклических оснований (нуклеозиды **2.6**) [121].



Схема 2.2. Схема синтеза 5'-нуклеозидтрифосфатов с использованием салицилхлорфосфита для монофосфорилирования.

Синтез целевого 5'-нуклеозидтрифосфата **2.4** проводят путем окисления циклического фосфита **2.8**, гидролиза триметафосфата **2.9** и последующего деблокирования (Схема 2.2). Этот метод также применим для получения 5'-α-тиотрифосфатов нуклеозидов, в случае если на стадии окисления заменить

элементарный йод на элементарную серу [121]. С использованием салицилхлорфосфита **2.5** (Схема 2.2) получено огромное количество модифицированных 5'-нуклеозидтрифосфатов с выходами 8-46 % [122-128]. Реагент **2.5** также нашел применение в твердофазном синтезе 5'-трифосфатов олигонуклеотидов [129] и 5'-трифосфатов олигонуклеотидов, содержащих заместитель по концевой фосфатной группе [130].

Ниапд с соавт. предложили иной подход к трифосфорилированию незащищенных нуклеозидов с использованием салицилхлорфосфита **2.5** (Схема 2.3) [131]. Метод основан на взаимодействии салицилхлорфосфита **2.5** с неорганическим пирофосфатом, а затем с нуклеозидом. Объемный фосфорилирующий агент **2.10**, полученный *in situ* на первой стадии, селективно реагирует с 5'-гидроксильной группой незащищенного нуклеозида **2.1**. При последующем окислении производного **2.11** и гидролизе триметафосфата **2.3** образуются целевые 5'-трифосфаты нуклеозидов **2.4**.



Схема 2.3. Синтез нуклеозид-5'-трифосфатов с использованием салицилхлорфосфита по методу [131].

Меіег с соавт. [132, 133] предложили использование замещенных хлорфосфитов **2.12** (Схема 2.4) для получения *цикло*салицилнуклеотидов **2.13** из соответствующих защищенных нуклеозидов **2.6**. В безводных условиях *цикло*салицилнуклеотиды **2.13** взаимодействуют с фосфатами, пирофосфатами и различными фосфомоноэфирами, при этом образуются 5'- ди- и трифосфаты нуклеозидов, 5',5'-ди- и тетрафосфаты динуклеозидов,

нуклеозид-дифосфо-сахара (**2.14**). Реакция протекает в течение 3-5 ч с выходом от 40 до 80 %.



 X = неорганический моно- или дифосфат;
 R = защитные группы нуклеозид-5`-моно- или дифосфат;
 углеводные фрагменты

2.2. Использование Н-фосфонатов

Активное производное салицилфосфит 2.7 (Схема 2.2) является весьма чувствительным к присутствию следов воды в реакционной смеси [119], поэтому основным продуктом реакции в синтезе трифосфатов согласно Схеме 2.2 может быть 5'-*H*-фосфонат нуклеозида. Этот недостаток был использован Peterson с соавт. в синтезе 5'-нуклеозидтрифосфатов из соответствующих 5'-Нфосфонатов нуклеозидов (Схема 2.5) [134]. Авторами предложен синтез 5'-Нфосфонатов нуклеозидов 2.16 путем обработки защищенных нуклеозидов 2.15 салицилхлорфосфитом 2.15 PCl₃. Последующий или гидролиз И деблокирование приводят к образованию нуклеозид-5'-*H*-фосфонатов 2.16 с выходом 71-85 %. При активации 5'-*H*-фосфоната **2.16** в присутствии триметилсилилхлорида и элементарного иода в пиридине образуется высоко соединение реакционноспособное **2.17**. Пиридинийфосфамид 2.17

Схема 2.4. Схема синтеза нуклеозид-5'-n-фосфатов и их конъюгатов при участии *цикло*салицилнуклеотидов.

взаимодействует *in situ* с неорганическим пирофосфатом, образуя соответствующий нуклеозид-5'-трифосфат **2.4** с выходом 26-40 %.



Схема 2.5. Синтез 5'-нуклеозидтрифосфатов из соответствующих 5'-*H*-фосфонатов нуклеозидов.

Этот подход к образованию пирофосфатной связи нашел применение в получении симметричных 5',5'-пирофосфатов нуклеозидов [135]. Ключевой стадией метода является контролируемый гидролиз фосфомоноэфира пиридиния **2.17** путем последовательного добавления 1 и 0.5 экв. воды в DMF.

Благодаря высокой реакционной способности P(III) и стабильности 5'-Н-фосфонатных производных разработан подход к твердофазному методу синтеза 5'-три- и 5'-дифосфатов олигонуклеотидов (2.22, Схема 2.6) [136, 137]. Фосфитилирование 5'-незащищенной гидроксильной группы олигонуклеотида 2.18 проводят на твердофазном носителе, в качестве фосфитилирующего агента при этом используют дифенилфосфит (2.19). 5'-Н-Фосфонатный остаток олигонуклеотида 2.20 окисляют при помощи CCl₄ или CBrCl₃ в присутствии имидазола и *N*,*O*-бис-триметилсилилацетамида до 5'-имидазолидного 2.21. активного производного Последующее взаимодействие 5'-имидазолидного производного олигонуклеотида 2.21 и неорганического монофосфата или пирофосфата приводит к практически полному превращению исходного олигонуклеотида 2.18 в 5'-ди или трифосфорилированное производное 2.22.



Схема 2.6. Синтез 5'-три- и 5'-дифосфатов олигонуклеотидов на твердофазном носителе.

2.3. Использование соединений, содержащих P-N связь

Как и нуклеозиды, их монофосфорилированные 5'-производные (нуклеотиды) по большей части являются коммерчески доступными; кроме того, монофосфорилирование нуклеозидов хорошо разработано [112, 138]. Поэтому синтез 5'-нуклеозидполифосфатов из соответствующих нуклеотидов, возможно, является наиболее удобным подходом к получению полифосфатных производных нуклеозидов. Данная синтетическая стратегия требует активации фосфатного остатка нуклеотида. Чаще всего этот подход реализуется через образование промежуточных продуктов, содержащих P-N связи.

2.3.1. Фосфоимидазолиды и фосфо(N-метил)имидазолиды

На протяжении десятилетий 5'-фосфоимидазолиды нуклеозидов **2.23** применяют в синтезе нуклеозидполифосфатов и их конъюгатов (Схема 2.7) [139], [140].



Схема 2.7. Общая схема синтеза нуклеозид-5'-полифосфатов и их конъюгатов с использованием 5'-фосфоимидазолидов.

Получение фосфоимидазолидов **2.23** возможно несколькими способами. Под действием *N*,*N*'-карбонилдиимидазола в безводных условиях в присутствии третичного амина нуклеозид-5'-моно- или дифосфаты (**2.25**) превращаются в интермедиат **2.26**, который немедленно переходит в 5'фосфоимидазолид **2.23** (Схема 2.8) [117, 141-143].



Схема 2.8. Синтез нуклеозид-5'-фосфоимидазолидов при помощи *N*,*N*'- карбонилдиимидазола.

Альтернативным методом получения имидазолидов **2.23** в безводных условиях является использование $Ph_3P/(PyS)_2$ в присутствии имидазола [144-146]. Активация концевой фосфатной группы полифосфатов нуклеозидов или олигонуклеотидов под действием окислительно-восстановительной пары $Ph_3P/(PyS)_2$ известна с конца 80х годов [147-149]. Эта реакция нашла широкое применение для получения различных 5'-фосфамидов моно- и полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов [150]. Редокс-пара $Ph_3P/(PyS)_2$ является весьма удобным реагентом для активации концевой фосфатной группы в олигонуклеотидах, поскольку не реагирует с межнуклеотидным фосфатом, гетероциклическими основаниями, оксигруппами углеводных остатков.

В литературе описана активация монофосфатов нуклеозидов (2.25, n=0) в водных условиях под действием хлорида 1,3-диметил-2-хлоримидазолия (DMC) в присутствии имидазола [151]. Авторами статьи обнаружено, что при смешивании DMC и имидазола в соотношении 1:2 в водных условиях происходит образование активного интермедиата 2.27 (Рис. 2.2). Под действием интермедиата 2.27 происходит образованием соединения 2.23 (n=0). Реакция проходит при нагревании (37 °C) в течение 1 часа, степень превращения при этом не превышает 70 %. Позднее на основе данного метода

~ 35 ~

опубликована работа по синтезу динуклеозид-5',5'-пирофосфатов (выход 32-68 %) и нуклеозид-5'-ди- (выход 22-40 %) и трифосфатов (выход 22-25 %) [107].



Рисунок 2.2. Хлорид 2-имидазолил-1,3-диметилимидазолия [151].

Фосфоимилазолилы 2.23 являются лостаточно стабильными соединениями, их возможно использовать как с выделением (осаждением), так и в реакции *in situ*. Благодаря их стабильности, реакции с участием имидазолидов 2.23 возможно проводить как в водных [140, 152], так и в безводных условиях. Более эффективно взаимодействие соединений 2.23 с другими моноэфирами фосфорной кислоты происходит при участии катионов двухвалентных металлов (Mg²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) [153, 154]. Такая гибкость в применении, несмотря на умеренные выходы (30-60 %) и длительное время реакции (до 5 дней), делает соединения 2.23 весьма привлекательными, а иногда и незаменимыми в синтезе нуклеозид-5'-дифосфосахаров [146], 5'полифосфатов нуклеозидов [117]; 5',5'-полифосфатов динуклеозидов [136, 142, 155-157]; 5'-кэпированных РНК [152, 158, 159]; аналогов НАД+ [20, 102, 103, 143]; 5'-три-, тетра- и пентафосфатов нуклеозидов, содержащих заместитель по концевой фосфатной группе [160, 161]. При использовании интермедиата 2.23 получены динуклеозид-5',5'-полифосфаты в качестве аналогов 5'-кэпированных РНК, однако в каждом случае условия реакции требуют оптимизации: выбор активирующего реагента, активация моно или дифосфата нуклеозида, время реакции, выбор катиона двухвалентного металла [155, 162-170].

Wright с соавт. предложили использовать *P¹*,*P²*-диимидазолидные производные пирофосфата **2.28** для получения симметричных динуклеозид-5',5'-тетрафосфатов **2.29** (Схема 2.9) [171]. *P¹*,*P²*-Диимидазолидные
производные пирофосфата 2.28 получают путем обработки неорганического *N*,*N*-карбонилдиимидазолом В пирофосфата безводных условиях В Последующее присутствии третичного амина. взаимодействие 2.28 нуклеотидами 2.25 приводит диимидазолидов с к получению симметричных тетрафосфатов 2.29 (выход 70-80 %) в течение 1-2 дней. При использовании вместо неорганического пирофосфата метиленбисфосфонатов и их галогенсодержащих производных получают симметричные динуклеозид-5',5'-тетрафосфонаты (выход 60-80 %) [171, 172].





Использование *N*-метилимидазола вместо имидазола приводит к образованию более реакционноспособного цвиттерионного производного **2.30** (Схема 2.10) [173, 174]. *N*-Метилимидазолид **2.30** легко реагирует с различными моноэфирами фосфорной кислоты в сухих условиях, при этом образуются полифосфатные производные **2.31**. Замена имидазола на *N*-метилимидазол на стадии активации фосфатной группы уменьшила время реакции между фосфо(*N*-метил)имидазолидом и другим фосфатом с часов (16-72 ч) до минут (20-60 мин) [175, 176]. Получение *N*-метилимидазолидных производных по фосфатной группе **2.30** возможно несколькими способами: с использованием редокс-пары $Ph_3P/(PyS)_2$ [177, 178]; трифторуксусного ангидрида [179]; соли сульфонилимидазолия (**2.32**) [180-182] в присутствии *N*-метилимидазола (Схема 2.10).



X = неорганический моно- или дифосфат; нуклеозид-5`-моно- или дифосфат; углеводные фрагменты и т.д.

Схема 2.10. Синтез нуклеозид-5'-фосфо(*N*-метил)имидазолидов и нуклеозид-5'-полифосфатных производных. Активирующие реагенты *i*) Ph₃P/(PyS)₂, *N*-MeIm; или (CF₃CO)₂O, *N*-MeIm; или 2.32, *N*-MeIm.

Несмотря на все преимущества, редокс-пара $Ph_3P/(PyS)_2$ не так широко используется для получения *N*-метилимидазолидов **2.30** по сравнению с имидазолидами **2.23** [162, 163]. При активации 5'-монофосфатов нуклеозидов или динуклеозидов парой $Ph_3P/(PyS)_2$ в присутствии *N*-MeIm в безводных условиях, активация проходит за минуты (5–10 мин). Последующее взаимодействие активного производного с различными моноэфирами фосфорной кислоты приводит к образованию нуклеозид-5'-тетрафосфатов [173], нуклеозид-5'-трифосфатов модифицированных по фосфатным группам (35-51 %) [183]; 5'-трифосфатов динуклеотидов (54-92 %) [174]; 5',5'пирофосфатов динуклеозидов (19-51 %) [104, 177]. Также, при использовании этого типа активации возможно получение симметричных пирофосфатов динуклеозидов *in situ* (85-90 %) [184].

В конце 90х годов Богачев опубликовал работу по методу получения природных 5'-трифосфатов 2'-дезоксирибонуклеозидов из соответствующих 5'-монофосфатов с выходами 89-92 % [185]. Метод основан на взаимодействии

~ 38 ~

N-метилимидазолида нуклеотида **2.30** (n=0) с неорганическим пирофосфатом. Соединение 2.30 (n=0) получают из незащищенного 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфата (*н*-Ви₃NH⁺ соль или свободная кислота) в две стадии. На 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфат первой стадии реагирует С трифторуксусным ангидридом (5-6 экв.), при этом образуется смешанный ангидрид с алкилфосфорной кислотой и одновременно происходит защита гидроксильной группы углеводного фрагмента И экзоциклической аминогруппы гетероциклического основания. На второй стадии реакционную смесь обрабатывают *N*-метилимидазолом, при этом образуется соединение **2.30** (n=0) с защитными группами по углеводному и гетероциклическому фрагментам. Позднее опубликованы работы по синтезу модифицированных 5'-нуклеозидтрифосфатов (выход 17 %) [186], полифосфатов динуклеозидов Np₂N, Np₂N', Np₃N' и Up₄A с выходами 61-68 %, 60-67 %, 51-58 %, и 60 %, соответственно [179], и нуклеозид-5'-дифосфосахаров (выходы 22-48 %) [187], [188], основанные на методе Богачева [185]. Авторы работ отмечают, что применима монофосфатов данная методика только для активации нуклеозидов.

Mohamady И Taylor [180] предложили использование солей 2.32 2.10) Nсульфонилимидазолия (Схема для получения метилимидазолидного производного **2.30** (n = 0, 1). Взаимодействие нуклеозид-5'-трифосфатов с этим реагентом приводит к образованию циклического триметафосфата. Авторы отмечают, что преимуществом этого метода являются достаточно высокие выходы целевых 5',5'-полифосфатов динуклеозидов (80-90 %). Позднее данный протокол был применен для получения нуклеозид-5'-n-фосфосахаров (n = 2-4), при этом выходы не превышали 8-20 % [182].

Соли сульфонилимидазолия (2.32) применяют для активации неорганического циклического триметафосфата (2.33) с получением *N*-метилимидазолида триметафосфата (2.35, Схема 2.10) [181]. Образование производного происходит аналогично активации моно- и дифосфатов

нуклеозидов через промежуточное образование смешанного ангидрида **2.34**. Последующее взаимодействие активированного триметафосфата **2.35** с монофосфатами нуклеозидов приводит к образованию нуклеозид-5'тетрафосфатов (83-86 %, [181], 21 %, [189]) и 5',5'-пентафосфатов динуклеозидов (77-85 %, [181]).



Схема 2.11. Синтез *N*-метилимидазолида циклического триметафосфата

2.3.2. Фосфоморфолиды и фосфопиперидиды

Активные производные моноэфиров фосфорной кислоты, фосфоморфолиды **2.36** (Y=O) и фосфопиперидиды **2.36** (Y=CH₂) (Схема 2.12), используют для образования пирофосфатной связи с начала 60х годов. В литературе известны примеры активации только монофосфатов.

Получение морфолидных/пиперидидных производных по фосфатной группе возможно несколькими способами: путем активации моноэфира фосфорной кислоты или с использованием *H*-фосфонатов и фосфамидитов.



Схема 2.12. Синтез нуклеозид-5'-полифосфатных производных при участии фосфоморфолидов/пиперидидов. Активирующие агенты (*i*) DCC или MesCl или Ph₃P/(PyS)₂.

Первые работы по синтезу морфолидов и пиперидидов опубликовали в 1960 г. Moffatt и Khorana [190]. Синтез морфолидов и пиперидидов 2.36 осуществляли путем взаимодействия 5'-нуклеозидмонофосфатов с DCC и морфолином/пиперидином в смеси *трет*-бутанол/вода при кипячении в течение 3-4 ч. При этом выход морфолидов составил 92-95 %, а пиперидидов - 40 %. Такая разница в выходах объясняется тем, что пиперидин является значительно более сильным основанием (pK_a 11.22 [191]), чем морфолин (pK_a 8.36 [191]). Также авторами показано, что добавление третичного амина при синтезе морфолидов снижало выход реакции до 10 %. Позднее была опубликована работа [192] по синтезу 5'-фосфоморфолидов олигонуклеотидов путем активации 5'-фосфатной группы мезитиленсульфонилхлоридом в безводном DMF в присутствии морфолина, выходы при этом количественные. Проведение реакции в DMF значительно сокращает время реакции образования морфолида и позволяет работать с три-*н*-алкиламмонийными солями олигонуклеотидов. Активация фосфатной группы при использовании редокс-пары $Ph_3P/(PyS)_2$ В безводных условиях присутствии В морфолина/пиперидина позволила получать соединения с практически

~ 41 ~

количественным выходом и без хроматографических очисток [145, 193-195]. Авторами статьи [196] предложена замена дипиридилдисульфида на более дешевый реагент – дитиодианилин.

Благодаря повышенной реакционной способности производных P(III) и стабильности 5'-*H*-фосфонатных производных, их используют в качестве исходных соединений в синтезе фосфоморфолидов и фосфопиперидидов (**2.36**). Так, метилфосфоморфолиды и пиперидиды были получены путем обработки метил-*H*-фосфоната CCl₄ и 1-(триметилсилил)морфолином или 1-(триметилсилил)пиперидином [154].

Позднее авторами статьи [135] предложен иной метод получения фосфопиперидидов. Синтез полностью защищенных фосфопиперидидов рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов проводили в 3 стадии: фосфитилирование под действием 1,2-диизопропилфосфамидита, затем кислотно-катализируемый гидролиз и окислительная конденсация под действием CCl₄/пиперидин/Et₃N. При этом выход фосфопиперидидов составил 75-85 %. Деблокирование соединений проводили каталитическим гидрированием в течение 3 ч.

Moffatt и Khorana исследовали образование пирофосфатной связи между 5'-фосфоморфолидами/пиперидами нуклеозидов 2.36 и производными фосфорной кислоты в безводном пиридине [190]. При использовании фенилфосфата реакция полностью завершается за 1 ч, однако при добавлении амина (триэтиламин) степень превращения продукта третичного не превышала 5 % за то же самое время. В случае реакции с неорганическим пирофосфатом степень превращения в целевой продукт нуклеозид-5'трифосфат составляла 57 % спустя 2 часа. При увеличении времени реакции до 24 ч по мере образования 5'-трифосфата происходит образование 5'дифосфата (76 %, продукт деградации трифосфата). Позднее Moffatt разработал метод синтеза рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов с выходом 81-84 % на основе взаимодействия нуклеозид-5'-фосфоморфолидов и неорганического пирофосфата в безводном DMSO [197], при этом время реакции составило 48-72ч. На основе этого протокола разработан метод синтеза 5'-трифосфатов олигонуклеотидов [192]. Также данный протокол применим для синтеза симметричных динуклеозид-5',5'-тетрафосфатов [198, 199], модифицированных нуклеозид-5'-трифосфатов (24-32 %, 0.5-7 суток) [200, 201], нуклеозид-5'-дифосфосахаров (20-50 %, 1-5 суток) [202-206].

Как и в случае 5'-фосфоимидазолидов, на скорость реакции 5'фосфоморфолидов и пиперидидов влияют катионы двухвалентных металлов, а именно Zn^{2+} , увеличивая выход продуктов реакции с 28 % до 58 %, время реакции при этом составляет 14 дней [154]. Опубликована работа по синтезу нуклеозид-5'-дифосфосахаров с использованием 1-*H*-тетразола в качестве катализатора в реакциях с фосфоморфолидами, что сократило время реакции до 1-2 дней и увеличило выходы до 76-91 % [207]. В тоже время в случае синтеза углеводо-1-дифосфолипидов при использовании фосфоморфолидов и 1-*H*-тетразола в качестве катализатора выходы составили 20-33 %, а время реакции – до 5 дней [208].

В работе [135] изучена реакционная способность пиперидидов и морфолидов при синтезе нуклеозид-5'-три- и дифосфатов в присутствии слабокислых активаторов: 1-Н-тетразола, 4,5-дицианоимидазола, имидазолий-, *N*-метилимидазолий-, пиридиний- и диметиламинопиридинийхлоридов, 4нитрофенола и уксусной кислоты. При использовании морфолидов в присутствии 4,5-дицианоимидазола выход 5'-трифосфата составил 60-70 %, при этом время реакции составило 6 часов. Использование пиперидидов вместо морфолидов позволило увеличить выход реакции до 90-95 %. С соединений использованием В качестве исходных нуклеозид-5'фосфопиперидидов и дицианимидазола как активатора в реакции образования пирофосфатной связи получены нуклеозид-5'-ди- и трифосфаты [209], симметричные и несимметричные динуклеозид-5'-n-фосфаты (n=2-5) с выходом 30-80 % в течение 6-30 ч [210, 211]. В случае проведения реакции при нагревании до 40 °C, время реакции сокращается до 8 ч, выходы при этом составляют 56-62 % [212].

Ravalico и соавт. [213] предложили использование шаровой мельницы для активации аденозин-5'-фосфоморфолида в присутствии 1-*H*-тетразола и катионов Mg²⁺ в водных условиях в реакции с моноэфирами фосфорной кислоты. При этом выходы динуклеозид-5',5'-n-фосфатов (n=2-4) составили 45-75 %, а время реакции – 90 мин.

2.3.3. Амидофосфиты

Амидиты фосфора (III) являются высоко реакционноспособными соединениями и легко реагируют с нуклеофилами при слабокислом катализе. Амидофосфиты нашли широкое применение в автоматическом синтезе ДНК и РНК [214], однако о применении их для образования пирофосфатной связи известно мало. Возможно, это связано с высокой реакционной способностью фосфитилирующего реагента для получения амидофосфитных производных, что требует тщательного выбора защитных групп и трудоемких процедур синтеза исходных соединений.

Амидофосфиты нуклеозидов используют в качестве промежуточных соединений в получении таких активных производных как фосфоморфолиды и фосфопиперидиды [135].

В 2007 г. Parang и Ahmadibeni предложили твердофазный метод синтеза симметричных динуклеозид-п-фосфатов (n=1-4) (Схема 2.13) [215]. Подход основан на использовании фосфитилирующего реагента 2.38, который готовят олигомеризации дихлорфосфина 2.37. После этого путем полимер обрабатывают фосфитилирующим реагентом (2.39). Синтез симметричных динуклеозид-п-фосфатов (n=1-4) проходит в 4 стадии из соответствующих незащищенных нуклеозидов. Выход целевых продуктов 59-71 %. Авторы ланный подход отличается отсутствием отмечают, что очисток промежуточных соединений и использованием нефосфорилированных производных незащищенных нуклеозидов.



ROH = природные и модифицированные нуклеозиды

Схема 2.13. Синтез симметричных динуклеозид-n-фосфатов на твердофазном носителе.

Синтез уридин-5'-дифосфосахаров (2.43)с использованием амидофосфита уридина 2.41 протекает в 3 стадии: конденсация, окисление и деблокирование (Схема 2.14) [216]. Ключевой стадией является образование фосфат-фосфитного интермедиата 2.42 В безводных условиях при использовании дицианоимидазола в качестве катализатора. Последующее окисление и деблокирование приводит к образованию продукта 2.43 с выходом 63-76 %.





Схема 2.14. Синтез уридин-5'-дифосфосахаров с использованием амидофосфита уридина.

Jessen опубликовали монофосфорилирования соавт. метод И незащищенных нуклеозид-5'-моно- и дифосфатов (Схема 2.15) [217, 218]. При обработке 5'-моно- или дифосфата нуклеозида амидофосфитом 2.44 в безводных условиях в присутствии фенилтетразола или 2-(этилтио)-1-Нкачестве катализаторов образуется фосфат-фосфитное тетразола В производное 2.45. Последующее окисление и деблокирование приводят к образованию нуклеозид-5'-ди- (77-93 %) и трифосфатов (68-79 %).



Схема 2.15. Монофосфорилирование незащищенных нуклеозид-5'-моно- и дифосфатов.

~ 46 ~

Этими же учеными [110] предложен метод синтеза динуклеозид-5',5'полифосфатов с нечетным количеством фосфатных групп (3, 5,7). Ключевой стадией в димеризации нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатов является образование фосфат-фосфит-фосфатного интермедиата **2.48**. Соединение **2.48** образуется при использовании амидофосфитного реагента **2.46** в реакции с нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатами в присутствии 2-(этилтио)-1-*H*тетразола. Последующее окисление и деблокирование соединения **2.48** приводит к образованию динуклеозид-5',5'-n-фосфатов (n=3, 45-68 %; n=5, 50 %; n=7, 18 %)



Схема 2.16. Синтез динуклеозид-5',5'-n-фосфатов (n = 3, 5, 7)

2.4. Карбодиимиды в реакции образования пирофосфатной связи

Карбодиимиды являются одними из первых активирующих агентов концевой фосфатной группы как моно-, так и полифосфатов нуклеозидов [219], однако низкие выходы целевых продуктов привели к ограниченному использованию карбодимидов в образовании пирофосфатной связи.

Тем не менее, карбодиимиды применяют для активации 5'-трифосфатов нуклеозидов **2.4** с образованием циклического триметафосфата нуклеозида **2.3**

(Схема 2.17). Активация проходит в течение часа в безводных условиях. В качестве карбодиимидов чаще всего используют DCC, DIC, EDC·HCl.



Схема 2.17. Реакция взаимодействия карбодиимидов с нуклеозид-5'трифосфатами.

Циклический триметафосфат **2.3** реагирует с моноэфиром фосфорной кислоты с образованием 5'-тетрафосфатов нуклеозидов, содержащих заместитель по δ-фосфату. Реакция проходит достаточно медленно (1-2 дня), нередко требует нагревания до 40 °C, а выходы целевых продуктов составляют 6-43 % [117, 118, 160, 220].

Синтез симметричных тетрафосфатов и их аналогов также возможен при участии карбодиимидов. Реакцию проводят путем активации 5'-дифосфатов или метиленбисфосфонатов нуклеозидов *in situ* в безводных условиях [221, 222]. После десятилетий исследований в области разработки простых, эффективных и универсальных методов синтеза 5'-полифосфатов нуклеозидов и их аналогов появилось несколько эффективных стратегий и методов получения целевых соединений как из нуклеозидов, так и нуклеотидов. Однако исследования в данной области продолжаются из-за высокого терапевтического потенциала нуклеозидных аналогов и их активных фосфорилированных форм.

Существующие синтетические подходы основаны на применении химии P(V) и/или P(III) [109]. Среди ряда подходов, направленных на получение производных нуклеозид-5',5'-полифосфатов и меченных по концевому фосфату нуклеозид-5'-полифосфатов, методы, основанные на использовании незащищенных нуклеотидов в качестве исходных соединений (активации фосфата (V)), -выглядят более перспективными, несмотря на умеренные выходы и длительное время реакции. Тщательный подбор активирующих агентов, растворителей и стратегии конденсации (конъюгации) могут помочь увеличить выходы и сократить время реакции. Другой подход, при котором используют защищенные нуклеозиды, способен привести к получению продуктов с высоким выходом за короткое время, благодаря использованию химии фосфора (III). Однако в этом случае активное производное фосфора (III) более чувствительно к присутствию следов воды в реакционной смеси и требует чрезвычайной сухости как исходных реагентов, так и растворителей. Кроме того, введение защитных групп в нуклеозиды и последующее их удаление часто является многостадийным процессом, что существенно затрудняет синтез целевых продуктов.

Таким образом, разработка метода образования пирофосфатной связи, не требующего введения защитных групп и позволяющего получить целевые пирофосфатные производные за короткое время, с высокими выходами и минимальным содержанием побочных продуктов, является актуальной задачей при синтезе 5',5'-полифосфатов динуклеозидов и нуклеозид-5'- полифосфатов, модифицированных по концевому фосфату.

ГЛАВА 3. ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО β-ФОСФАТУ ПРОИЗВОДНЫХ АДФ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПАРП 1 (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

Субстратом ПАРП является молекула НАД+ (Рис. 3.1). Структура НАД+ представляет собой 5',5'-пирофосфат динуклеозида, состоящий из остатков аденозина и никотинамидрибозида соединенных 5',5'-пирофосфатной связью. Практически все существующие ингибиторы ПАРП являются структурными аналогами никотинамида и взаимодействуют с аминокислотами никотинамидсвязывающего участка каталитического центра фермента, не затрагивая при этом аденозин- и фосфат-связывающие участки [84]. Согласно литературным данным, соединения взаимодействующие со всеми тремя участками НАД+сайта каталитического центра фермента могут проявлять более эффективное ингибирующее действие в отношении ПАРП 1 [37].

В литературе нет данных по исследованию соединений, содержащих все три части молекулы НАД+, т.е. структурных аналогов НАД+, в качестве ингибиторов ПАРП. Однако известно, что 5',5'-пирофосфаты динуклеозидов, представляющие собой аналоги НАД+, являются ингибиторами НАДзависимых ферментов: ИМФ-дегидрогеназы [15-17], НАД⁺-киназы [18], бактериальной ДНК-лигазы [19], и CD38/НАД⁺-гликогидролазы [20].

В настоящей работе мы предлагаем новый класс потенциальных ингибиторов ПАРП на основе производных аденозин-5'-дифосфата, модифицированных по концевой фосфатной группе (Рис. 3.1). Эти соединения являются структурными аналогами НАД+, 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.



Рисунок 3.1. Структура НАД+ и конъюгатов АДФ серий I, II, III.

Первая серия (I) содержит производные ароматических карбоновых кислот, присоединенные по β-фосфату АДФ через алифатический линкер. Бензамид и его производные, содержащие заместители по 2, 3, 4 положениям

~ 52 ~

бензольного кольца, проявляют ингибирующие свойства в отношении ПАРП 1, например 3-гидроксибензамид IC₅₀ = 9.1 мкМ [55, 223]. Мы 17 ароматических карбоновых использовали кислот с различными заместителями по ароматическому кольцу в качестве структурных аналогов никотинамида. В качестве соединяющего фрагмента между молекулой АДФ и ароматических карбоновых кислот предлагаем производными ΜЫ использование алифатической линкерной группы вместо углеводного фрагмента – рибозы.

Вторая серия (II) миметиков НАД+ основана на использовании двух морфолиновых аналогов нуклеозидов, типов имитирующих никотинамидрибозид (Рис. 3.1). Серия IIa содержит 2'аминометилморфолиновые аналоги нуклеозидов, присоединенные к молекуле АДФ через алифатический линкер в сочетании с остатком щавелевой кислоты. Точками соединения в молекуле АДФ является β-фосфат, а в молекуле морфолинового нуклеозида – 2'-аминометильная группа.

Вторым типом морфолиновых аналогов нуклеозидов в серии **II** являются 2'-аминометил-4'-карбоксиметилморфолиновые нуклеозиды (**II6**). Использование такого типа морфолиновых нуклеозидов позволило изменить точку соединения морфолинового нуклеозида с молекулой АДФ. В серии **II6** точкой соединения молекулы морфолинового нуклеозида является 4'-положение, что способствует изменению положения морфолинового нуклеозида в пространстве.

При исследовании ингибирующей активности 5',5'-полифосфатов диаденозина, Ap_nA n=2-6, в реакции АДФ-рибозилирования гистона H1 обнаружено, что при n=4-6 происходит снижение ферментативной активности [26]. 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+.

В литературе описаны примеры использования 5',5'-пирофосфатов динуклеозидов в качестве ингибиторов или субстратов НАД-зависимых ферментов. 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'гидроксиметилморфолиновые аналоги нуклеозидов (IIIa) 2'-И аминометилморфолиновые (Шб). В рамках этой серии мы предлагаем исследовать влияние изменения расположения молекулы АДФ по отношению морфолинового нуклеозида 2'молекуле за счет изменения К гидроксиметильной группы на 2'-аминометильную группу.

Использование морфолиновых нуклеозидов для конструирования миметиков НАД+ серий **II** и **III** обусловлено их широким применением для миметиков нуклеиновых синтеза кислот, В том числе проходящих клинические испытания для лечения различных патологий [224, 225]. В то же время этот тип модифицированных нуклеозидов в виде мономеров или конъюгатов низкомолекулярных практически изучен не В качестве ингибиторов каких-либо биохимических процессов.

Ключевой стадией синтеза соединений серий **I**, **II**, **IIIa** (Рис. 3.1) является образование пирофосфатной связи между АМФ и фосфатной группой ненуклеотидного или нуклеотидного производного. Поэтому первой задачей нашего исследования являлась оптимизация метода образования пирофосфатной связи в фосфатных производных нуклеозидов.

3.1. Оптимизация метода образования пирофосфатной связи в фосфатных производных нуклеозидов

К настоящему моменту разработано огромное количество методов образования пирофосфатной связи (см. Глава 2). 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 **3.1**, $rAp_2dT(3'-N_3)$. На Рисунке 3.2 представлена ретросинтетическая схема образования $rAp_2dT(3'-N_3)$ (3.1). Ключевой стадией является реакция конденсации между фосфатной группой одного нуклеозида и активным фосфатным производным другого нуклеозида. Поскольку АМФ (3.2) является доступным реагентом, то активное производное фосфатной группы получали на основе З'-азидотимидина. Активное производное фосфата Χ возможно двумя способами: 1) путем образования получить непосредственно из нуклеозида и 2) путем активации монофосфатной группы нуклеотида.



Рисунок 3.2. Ретросинтетическая схема образования rAp₂dT(3'-N₃). 3.1.1. Способ 1. Образование активированного производного фосфата из нуклеозида.

Одним из самых высоко реакционноспособных производных фосфора (V) является дихлорфосфат (см. Глава 2.1). С использованием этого типа

получения разработаны методы 5'-триактивного производного И нуклеозидов [114-116], 5'-трифосфатов тетрафосфатов природных модифицированных нуклеозидов и динуклеотидов [119, 120]. 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 pearupyet 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, З'-азидотимидин (**3.3**).

3'-Азидотимидин (**3.3**) не требует введения защитных групп, поскольку содержит только одну первичную гидроксильную группу по 5'-положению, а гетероциклическое основание не содержит экзоциклических аминогрупп. Реакцию монофосфорилирования 3'-азидотимидина (**3.3**) проводили под действием POCl₃ в пиридине аналогично работе [120] с некоторыми модификациями. Согласно протоколу [120] избыток POCl₃ составляет 2 экв. Для минимизации содержания в реакционной смеси активных форм фосфора, мы использовали 1.2 экв. POCl₃. Синтез пирофосфата **3.1** осуществляли в 2 стадии (Схема 3.1).





Нуклеозид **3.3** обрабатывали РОСl₃ (1.2 экв.) в пиридине при охлаждении на ледяной бане. Через 15 минут реакционную смесь монофосфорилирования добавляли к раствору *н*-Вu₃NH⁺ соли АМФ (**3.2**, 1 экв.) в пиридине. Реакционную смесь выдерживали в течение 2 часов при комн. температуре, затем разлагали 1 М ТЭАБ и упаривали. В спектре³¹Р ЯМР реакционной смеси обнаружены сигналы дизамещенных пирофосфатов, δ (³¹P) -10.8 – (-11.8) м.д., и моноэфиров фосфорной кислоты, δ (³¹P) 1.8 – (-1.8) м.д. (Рис. 3.3).

Разделение продуктов реакции проводили методом АОХ и ОФХ. Согласно данным спектроскопии ЯМР ¹Н и ³¹Р среди продуктов реакции пирофосфат **3.1** не обнаружен. Возможно это связано с неполным монофосфорилированием 3'-азидотимидина (**3.3**).



Рисунок. 3.3. Спектр ³¹Р ЯМР реакционной смеси образования rAp₂dT(3'-N₃) в пиридине.

В литературе известен метод селективного монофосфорилирования 5'гидроксильной группы *природных* незащищенных нуклеозидов с выходами от 88 до 98 % [112]. Метод основан на использовании хлорокиси фосфора (V) в триалкилфосфате. Региоселективность реакции объясняется образованием комплекса нуклеозид-триалкилфосфат (см. Глава 1). 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 [108, 117, 118].

Монофосфорилирование 3'-азидотимидина (**3.3**) проводили аналогично работе [112] в триметилфосфате с POCl₃ (1.2 экв.). Однако мы не наблюдали протекания реакции в этих условиях. Увеличение времени реакции (до 24 ч), увеличение температуры (с -10 °C до +25 °C) и использование большего количества POCl₃ (до 3 экв.) не способствовало монофосфорилированию гидроксильной группы и образованию каких-либо продуктов. Добавление избытка *н*-Bu₃N (3 экв.) привело к монофосфорилированию 5'-гидроксильной группы соединения **3.3**. Чтобы оценить степень образования дихлорфосфата **3.4** образец реакционной смеси разлагали водой. При гидролизе дихлорфосфата **3.4** образуется монофосфат нуклеозида **3.5** (Схема 3.1), по количеству которого определяли степень образования интермедиата **3.4**. Степень образования монофосфата нуклеозида **3.5** составляла 40-50 % по данным ВЭЖХ.

Таким образом, синтез пирофосфата **3.1** проводили в 2 стадии (Схема 3.1). На первой стадии 3'-азидотимидин **3.3** (1 экв.) обрабатывали POCl₃ (1.2 экв.) в присутствии *н*-Вu₃N (3 экв.) в триметилфосфате в течение 30 мин при охлаждении на ледяной бане. На второй стадии проводили конденсацию *in situ* интермедиата **3.4** с АМФ (**3.2**, 3 экв., *н*-Вu₃NH⁺ соль) в триметилфосфате. Реакционную смесь выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Очистку целевого продукта **3.1** проводили при помощи двух хроматографий, АОХ и ОФХ. Выход соединения **3.1** составил 25 %. В случае использования меньших количеств АМФ (0.5-1.5 экв.) пирофосфат **3.1** среди продуктов реакции не был обнаружен.

3.1.2. Способ 2. Образование активированного производного фосфата путем активации 5'-монофосфата нуклеозида.

Как сказано ранее, получение активного фосфатного производного **X** (Рис. 3.2) возможно осуществить путем активации монофосфатной группы нуклеотида.

Для реализации этого способа на первой стадии необходимо провести монофосфорилирование 5'-гидроксильной группы 3'-азидотимидина (**3.5**). При использовании метода Yoshikawa [112], POCl₃ в триметилфосфате, степень образования монофосфата **3.5** не превышала 40-50 %, также в реакционной смеси присутствовал исходный 3'-азидотимидин **3.3**. Увеличение количества *н*-Вu₃N (5-10 экв.) не способствовало образованию монофосфата **3.5**.

Монофосфорилирование соединения **3.3** проводили под действием POCl₃ (2 экв.) в пиридине при охлаждении на ледяной бане аналогично работе

[120]. Однако выход целевого продукта **3.5** не превышал 50 % после очистки методом ОФХ. Варьируя условия проведения реакции монофосфорилирования, – количество POCl₃ (2-4 экв.), температура (0 – -15 °C) и время (5-30 мин), – мы обнаружили, что практически количественное монофосфорилирование происходит при использовании 4 экв. POCl₃ за 15 мин при -15 °C. Таким образом, синтез 5'-монофосфата 3'-азидотимидина (**3.5**) проводили под действием POCl₃ (4 экв.) в пиридине в течение 15 мин при -15 °C (Схема 3.2). Выход целевого монофосфата **3.5** составил 80 % после очистки методом ОФХ.



Схема 3.2. Синтез rAp₂dT(3'-N₃) с использованием фосфо(*N*метил)имидазолидного производного 3'-азидотимидина. Реагенты: (i) POCl₃, 1 M ТЭАБ; (ii) Ph₃P/(PyS)₂, *N*-MeIm; (iii) AMФ.

Самым широко используемым типом активных производных фосфоимидазолиды монофосфатов является (см. Глава 2.3.1). Фосфоимидазолиды являются достаточно стабильными соединениями, вследствие чего реакцию конденсации с другим фосфатом проводят как в безводных, так и в водных условиях (см. Глава 2.3.1). Одними из самых явных недостатков использования фосфоимидазолидов являются длительное время реакции и различные выходы целевых продуктов. Использование N-MeIm вместо имидазола на стадии активации фосфатной группы приводит к образованию более активного интермедиата, использование которого уменьшает время реакции на стадии образования пирофосфатной связи, однако требует проведения реакции в сухих условиях. В Главе 2.3.1 описано несколько способов получения *N*-метилимидазолидных производных по фосфатной группе. Одним из них является использование редокс-пары $Ph_3P/(PyS)_2$. фосфатной Активация концевой группы полифосфатов действием нуклеозидов ИЛИ олигонуклеотидов под окислительновосстановительной пары Ph₃P/(PyS)₂ известна с конца 80х годов [147-149]. Эта реакция нашла широкое применение для получения различных 5'-фосфамидов моно- и полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов [150].

Активацию фосфатной группы **3.5** проводили под действием Ph₃P/(PyS)₂ в присутствии избытка *N*-MeIm аналогично протоколу [174]. Полноту протекания реакции активации анализировали методом TCX [174] по наличию продукта реакции активированного производного с морфолином (см. Экспериментальную часть). Активацию фосфатной группы считали завершенной в случае отсутствия исходного монофосфата.

Активация фосфатной группы h-Bu₃NH⁺ соли монофосфата **3.5** под действием Ph₃P/(PyS)₂ (3 экв.) в присутствии избытка *N*-MeIm (12 экв.) в сухом DMI заканчивалась за 15 мин (Схема 3.2). Интермедиат **3.6** возможно использовать для конденсации с АМФ (**3.2**) *in situ* или после выделения (осаждения). Нами опробованы оба варианта.

• Использование интермедиата 3.6 in situ

В случае использования интермедиата 3.6 in situ, к смеси реакции активации добавляли раствор *н*-Ви₃NH⁺ соли АМФ (**3.2**, 4 экв) в сухом DMI. Реакцию проводили в течение часа при комн. температуре. Очистку соединения 3.1 проводили методом ОФХ в 0.1 М ТЭАБ. Выход 5',5'пирофосфата 3.1 составлял 80-75 %. Помимо соединения 3.1 в ходе реакции образовался симметричный пирофосфат 3.7. Выход 5',5'-пирофосфата диаденозина **3.7** составлял от 0 до 60 % в расчете на исходный АМФ (**3.2**). Образование соединения 3.7 и вариабельность его выхода можно объяснить присутствием в реакционной смеси избытков активирующих агентов Ph₃P/(PyS)₂ (3 экв.) и наличием/отсутствием следов воды. Использование меньших количеств активирующих агентов Ph₃P/(PyS)₂ приводит К неколичественному образованию *N*-метилимидазолидного производного **3.6**. Использование же меньших количеств АМФ приводит к неполному превращению интермедиата 3.6 в 5',5'-пирофосфат 3.1.

• Использование интермедиата 3.6 после выделения (осаждения)

Выделение *N*-метилимидазолидного производного **3.6** осуществляли путем добавления к реакционной смеси диэтилового эфира. После удаления супернатанта к образовавшемуся осадку добавляли раствор *н*-Bu₃NH⁺ соли АМФ (1.2-1.5 экв.) в сухом DMI. Реакцию проводили в течение часа при комн. температуре. Очистку соединения 3.1 проводили методом ОФХ в 0.1 М ТЭАБ. Выход 5',5'-пирофосфата 3.1 составил 60 %. Помимо целевого пирофосфата 3.1 из реакционной удалось выделить 5'-монофосфаты 3'смеси (3.5 и 3.2). Наличие монофосфата 3'азидотимидина и аденозина азидотимидина 3.5 возможно объяснить присутствием следов воды в используемых растворителях и реагентах. Преимуществом этого способа проведения реакции, с промежуточной очисткой *N*-метилимидазолидного производного 3.6 от избытка активирующих реагентов, является возможность повторного использования монофосфатов нуклеозидов 3.5 и 3.2.

3.2. Синтез конъюгатов АДФ серий I и II

Как сказано ранее, первая серия (**I**) содержит производные ароматических карбоновых кислот, присоединенные по β-фосфату АДФ через алифатический линкер. Вторая серия (**II**) включает в себя два типа морфолиновых аналогов нуклеозидов, которые присоединены по β-фосфату АДФ через алифатический линкер, аналогично серии **I** (Рис. 3.4).



Рисунок 3.4. Структура ключевого соединения (А) для конструирования серий I и II.

Согласно Рисунку 3.4 серии I и II основаны на использовании общего соединения предшественника A. Поэтому первоочередной задачей в получении соединений серий I и II являлся синтез конъюгата АДФ с аминолинкером (A) – ключевого соединения для конструирования серий I и II. Для исследования влияния длины алифатического линкера на

ингибирующие свойства соединений серий **I** и **II** предложено использование двух аминоспиртов: 2-(2-аминоэтокси)этанол (**3.8**) и 3-аминопропанол (**3.9**).

3.2.1. Синтез конъюгата АДФ с аминолинкером

На Рисунке 3.5 представлена ретросинтетическая схема синтеза конъюгата АДФ общей структурной формулой **A**. Ключевой стадией синтеза соединения **A** являлось образование пирофосфатной связи между АМФ и *O*-монофосфатом *N*-защищенного аминоспирта **B**.



Рисунок 3.5. Ретросинтетическая схема синтеза конъюгата АДФ. *3.2.1.1. Синтез О-монофосфата N-защищенного аминоспирта*

B настоящее время известны различные способы монофосфорилирования спиртов, включая производные нуклеозидов [109, 226, 227]. Для селективного О-фосфорилирования аминоспиртов, содержащих алифатическую аминогруппу, необходимо введение защитной группы по аминокомпоненте. В литературе известно большое количество *N*-защитных групп [228]. Так, одной ИЗ широко используемых является 9флуоренилметоксикарбонильная (Fmoc) группа [229, 230]. Fmoc-группа не проблем с введением и последующем деблокированием. вызывает Деблокирование проводят при помощи β-элиминирования в мягких безводных условиях или в условиях основного гидролиза [231]. Существуют также F⁻чувствительные силильные группы, удаляемые в нейтральных условиях [228]; кислотолабильные – трифенилметильные (Tr) группы [232, 233] и ацильные группы, расщепляемые в условиях водного аммиака или щелочей [232].

В ходе исследования мы протестировали 4 различные защитные группы монофосфорилирования 2-(2-аминоэтокси)этанола (3.8): В условиях монометокситритильную тритильную (Tr), (MMTr), 9флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc) и трифторацетильную (TFA) группы.

• <u>Тритильная (Tr) и монометокситритильная (MMTr) группы</u>

Тритильная (Tr) и монометокситритильная (MMTr) группы являются кислотолабильными защитными группами. Введение Tr или MMTr группы по аминогруппе линкера **3.8** осуществляли под действием TrCl или MMTrCl (1.2 экв.), соответственно (Схема 3.3).



Схема 3.3. Монофосфорилирование *N*-Tr- и *N*-MMTr-аминоспиртов. Реагенты (i) DMF, TrCl, Et₃N; (ii) DMF, MMTrCl, Et₃N; (iii) POCl₃, Py.

Реакцию проводили в присутствии Et₃N (3 экв.) в сухом DMF. Выход соединений **3.10** и **3.11** после хроматографической очистки составил 80-85 %.

Монофосфорилирование *N*-Tr-аминоспирта **3.10** проводили под действием POCl₃ (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 **3.12** экстрагировали CH₂Cl₂. Выход монофосфата **3.12** составил 75 %. Поскольку условия деблокирования Tr-группы с первичной аминогруппы достаточно «жесткие» для нуклеозидных производных, мы попытались применить более лабильную MMTr группу. Реакцию монофосфорилирования *N*-MMTr-аминоспирта **3.11** проводили в пиридине с POCl₃. После разложения и упаривания реакционной смеси происходило частичное деблокирование MMTr-группы (Рис. 3.6). При попытке выделить соединение **3.13** методом AOX происходило полное деблокирование аминогруппы с образованием *O*-монофосфата аминоспирта **3.14**.



Рисунок 3.6. ВЭЖХ профили исходного *N*-ММТг-аминоспирта 3.11 (А) и реакционной смеси реакции монофосфорилирования *N*-ММТг-аминоспирта 3.11 (Б) (условия ВЭЖХ см. Экспериментальную часть).

• 9-Флуоренилметоксикарбонильная (Fmoc) группа

Преимуществом Fmoc-группы является возможность её удаления в мягких слабощелочных условиях. Введение Fmoc-защитной группы по аминогруппе линкера **3.8** осуществляли по методу [230], при этом выход

~ 67 ~

составил 91 %. Монофосфорилирование *N*-Fmoc-аминоспирта **3.15** проводили под действием POCl₃ (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 **3.16** не удалось, так как при упаривании реакционной смеси происходило полное деблокирование аминогруппы с образованием монофосфата **3.14** (Схема 3.4).

Нами предложен альтернативный метод получения соединения **3.16**. Монофосфорилирование *N*-Fmoc-защищённого аминоспирта **3.15** проводили с использованием POCl₃ в сухом MeCN в присутствии минимально необходимого количества Et₃N при комнатной температуре в течение часа. Реакционную смесь разлагали водой. После хроматографической очистки выход целевого соединения **3.16** составил 75-85 %.



Схема 3.4. Монофосфорилирование *N*-Fmoc-аминоспирта 3.15. Реагенты: (i) FmocCl; (ii) POCl₃, Py, 1 M ТЭАБ; (iii) POCl₃, Et₃N, MeCN, H₂O.

• <u>Трифторацетильная (TFA) группа</u>

Трифторацетильная группа является менее лабильной по сравнению с Fmoc-группой. Введение трифторацетильной группы по аминогруппе соединения **3.8** проводили в метаноле под действием этилового эфира трифторуксусной кислоты в присутствии Et₃N (Схема 3.5). Выход соединения **3.17** после хроматографической очистки составил 80 %. Реакцию монофосфорилирования *N*-TFA-аминоспирта **3.17** проводили в пиридине с POCl₃. Выход *О*-монофосфата *N*-TFA-аминоспирта **3.18** после очистки методом ОФХ составил 80 %.



Схема 3.5. Монофосфорилирование *N*-TFA-аминоспирта 3.17. Реагенты: (i) CF₃COOEt, Et₃N, MeOH; (ii) POCl₃, Py, 1 M ТЭАБ.

Таким образом, из 4 возможных монофосфатов, соединения 3.12, 3.13, **3.16**, **3.18**, нами получены только 3, соединения **3.12**, **3.16**, **3.18**. В условиях фосфорилирования ОН-группы под действием POCl₃ в пиридине и очистки соответствующих монофосфатов стабильными защитными NH₂-группами являлись Tr и TFA, т.е соединения 3.12 и 3.18. В случае Fmoc-группы, соединение 3.16, подобраны оптимальные условия монофосфорилирования, POCl₃/Et₃N в MeCN. Несмотря на то, что нами успешно получен Омонофосфат *N*-трифенилметил-2-(2-аминоэтокси)этанола 3.12 без хроматографических очисток, мы полагаем, что «жесткие» условия деблокирования могут повлиять на стабильность *N*-гликозидной связи аденозина. Нами также получен О-монофосфат N-трифторацетил-2-(2аминоэтокси) этанола 3.18 с высоким выходом. Несмотря на все преимущества данной защитной группы, «мягкие» условия введения и деблокирования, стабильность в условиях реакции монофосфорилирования, соединение 3.18 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 N-Fmoc-2-(2-аминоэтокси)этанола 3.15, мы полагаем что самой эффективной защитной группой для получения *О*-монофосфата **В** является Fmoc-группа (Рис. 3.5).

Для исследования влияния длины алифатического линкера на ингибирующие свойства соединений серий I и II предложено использование двух аминоспиртов: 2-(2-аминоэтокси)этанола (**3.8**) и 3-аминопропанола (**3.9**) (Рис. 3.4). Синтез *О*-монофосфата **3.20** осуществляли в две стадии, аналогично соединению **3.16**. На первой стадии проводили введение Fmoc-защитной группы по аминогруппе линкера **3.9**. Монофосфорилирование *N*-Fmocзащищенного аминоспирта **3.19** проводили при использовании POCl₃ в сухом MeCN в присутствии Et₃N при комнатной температуре в течение часа. Реакционную смесь разлагали водой. После хроматографической очистки выход целевого соединения **3.20** составил 75 % (Схема 3.6).



Схема 3.6. Синтез *О*-монофосфата-*N*-Fmoc-аминопропанола. Реагенты: (i) FmocCl; (ii) POCl₃, Et₃N, MeCN, H₂O.

3.2.1.2. Образование пирофосфатной связи между АМФ и О-монофосфатом N-защищенного аминолинкера

Основным соединением-предшественником в синтезе серий I и II является конъюгат АДФ общей структурной формулой A (Рис. 3.5). Синтез конъюгата 3.25/3.26 осуществляли путем активации фосфатной группы *О*монофосфата *N*-Fmoc-аминолинкера 3.16/3.20 и последующем взаимодействии с АМФ (Схема 3.7). Реакцию активации соединения 3.16/3.20 проводили аналогично активации 5'-монофосфата 3'-азидотимидина, подробно описанной в Главе 3.1.2. Интермедиат **3.21/3.22** использовали *in situ* в реакции с *н*-Ви₃NH⁺ солью АМФ **3.2**. Выход пирофосфатов **3.23** и **3.24** после хроматографической очистки составил 80 и 61 %, соответственно. Деблокирование *N*-Fmoc-конъюгатов **3.23** и **3.24** проводили при помощи обработки конц. водным раствором аммиака в течение 12 ч. Затем реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в метаноле и осаждали продукт Et₂O. Выход целевых конъюгатов АДФ **3.25** и **3.26** после деблокирования составил 93 и 92 %, соответственно.



Схема 3.7. Синтез конъюгатов АДФ с аминолинкером. Реагенты: (i) Ph₃P/(PyS)₂, *N*-MeIm, DMI; (ii) АМФ; (iii) конц. водн. NH₃.

3.2.2. Синтез соединений серии I

Серия I представляет собой производные аденозин-5'-дифосфата, содержащие по концевой фосфатной группе остатки ароматических карбоновых кислот, присоединенные через алифатический линкер. Для анализа влияния природы ароматической кислоты и её заместителей на

ингибирующие свойства соединений конечных конъюгатов нами выбрано 17 различных ароматических кислот.

Синтез библиотеки соединений серии I осуществляли путем конденсации *N*-гидроксисукцинимидных эфиров ароматических кислот и конъюгатов АДФ **3.25** и **3.26**, содержащих в своей структуре алифатическую аминогруппу (Схема 3.8). В результате получено 22 конъюгата АДФ, модифицированных по β-фосфату, соединения **3.27-3.48**.



Схема 3.8. Синтез соединений серии I. Реагенты: (i) DCC, HOSu, DMSO; (ii) 3.25 или 3.26, 1М NaHCO₃/Na₂CO₃.
3.2.3. Синтез соединений серии II

Как сказано ранее, вторая серия (II) включает в себя два типа морфолиновых аналогов нуклеозидов, которые присоединены по β-фосфату АДФ через алифатический линкер, аналогично серии I (Рис. 3.7). Серия IIa основана 2'-аминометилморфолиновых на аналогах нуклеозидов. Присоединение 2'-аминометильной группы к β-фосфату АДФ осуществлено через алифатическую линкерную группу в сочетании с остатком щавелевой ПΩ 2'-аминометил-4'-Серия основана кислоты. на карбоксиметилморфолиновых аналогах нуклеозидов.



Серия II

Рисунок 3.7. Структура соединений серии II.

3.2.3.1. Синтез 2'-аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов



3.49 Base=Ura, **3.50** Base=Thy, **3.51** Base=Ade, **3.52** Base=Cyt, **3.53** Base=Gua

Рисунок 3.8. 2'-Аминометилморфолиновые аналоги нуклеозидов.

Синтез 2'-аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов 3.49-3.53 2'-Ha проводили три этапа. первом этапе получали В гидроксиметилморфолиновые нуклеозиды 3.74-3.78 из соответствующих рибонуклеозидов 3.54-3.58 (Схема 3.9). В синтезе использовали защищенные по экзоциклическим аминогруппам гетероциклических оснований рибонуклеозиды 3.56-3.58 (в случае урацила и тимина защитная группа не требуется). Образование морфолинового кольца проходит в три стадии: окисление, аминирование и восстановление.

B литературе известен метод синтеза 4'-*N*-Tr-морфолиновых производных 3.74-3.78, где в качестве исходных соединений используют 5'-Озащищенные рибонуклеозиды [234]. Авторы отмечают, что использование 5'рибонуклеозидов приводит О-защищенных К увеличению выходов морфолиновых нуклеозидов, с 12 до 52 % для тимидинового производного 3.75. Однако также известен метод синтеза, основанный на использовании 5'-О-незащищенных рибонуклеозидов [235].

Синтез морфолиновых аналогов нуклеозидов **3.74-3.78** проводили аналогично протоколу [235] с некоторыми изменениями (Схема 3.9). На первой стадии рибонуклеозиды **3.54-3.58** подвергали окислению NaIO₄ 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 **3.59-3.63**.

~ 75 ~ Base* Base* HO. Base* HO İİ, HO OH OH OH 3.54-3.58 3.64-3.68 3.59-3.63 Base* Base* HO 6 3.69-3.73

3.74-3.78

iii

HO.

Base [*] =Ura Base [*] =Ura Base [*] =Ura Base [*] =Ura Base [*] =0ra Base [*]	ase*=1hy	Base [*] = Ade ⁵²	Base*= Cyt ⁵²	Base [*] = Gual ^A
	55, 3.60	3.56, 3.61	3.57, 3.62	3.58, 3.63
	65, 3.70	3.66, 3.71	3.67, 3.72	3.68, 3.73
	75	3.76	3.77	3.78

Схема 3.9. Синтез 2'-гидроксиметил-4'-N-Tr-морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) NaIO₄; (ii) (NH₄)₂B₄O₇·4H₂O, Et₃N; (iii) NaCNBH₃, CF₃COOH; (iv) TrCl, Et₃N.

Вторая замыкание морфолинового цикла с стадия синтеза _ образованием основания Шиффа. К реакционной смеси периодатного окисления добавляли биборат аммония (1.2 экв.) и Еt₃N до значения pH реакционной смеси 8.5-9. Реакционную смесь выдерживали в течение 1.5 часов при тщательном контроле значения рН, которое поддерживали в диапазоне 8.5-9 путем добавления Et₃N. На третьей стадии проводили восстановление производных 3.64-3.68 цианборгидридом натрия в течение 30-40 минут. После разложения реакционной смеси трифторуксусной кислотой образовались соединения 3.69-3.73. Морфолиновые нуклеозиды 3.69-3.73 использовали без дополнительной очистки для введения Tr-защитной группы 4'-NH-группе морфолинового кольца. по Тритилирование NH-группы проводили при помощи TrCl с добавлением Et₃N (6 экв.) в сухом DMF. 4'-N-Tr-морфолиновые производные 3.74-3.78 получены с общим выходом 60-70 % без использования хроматографической очистки.

В результате работы по синтезу 4'-*N*-Tr-морфолиновых производных **3.74-3.78** 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.

Вторым этапом синтеза соединений 3.49-3.53 являлось получение 2'аминометил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов 3.89-3.93 ИЗ соответствующих морфолиновых нуклеозидов 3.74-3.78 (Схема 3.10). Синтез проводили в 2 стадии: 1) замена гидроксильной группы на азидогруппу и 2) восстановление азидогруппы до аминогруппы И одновременное деблокирование защитных групп гетероциклических оснований (Схема 3.10). Синтез проводили аналогично протоколу [236, 237]. На первой стадии 2'гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфорлиновые нуклеозиды **3.74-3.78** обрабатывали Ph₃P/CBrCl₃ (1.5 экв.) в сухом DMF, при этом происходило замещение гидроксильной группы на бром с образованием соединений 3.79-3.83. Последующее замещение брома на азидогруппу проводили *in situ* путем добавления избытка NaN₃ (10 экв.). Для восстановления азидогруппы 2'-3.84-3.88 азидометил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов использовали реакцию Штаудингера [238]. Соединения **3.84-3.88** обрабатывали Ph₃P в пиридине. Взаимодействие трифенилфосфина с азидогруппой приводит к иминофосфоранов [238]. При последующей образованию обработке реакционной смеси конц. водн. раствором аммиака происходили гидролиз иминофосфоранов И деблокирование экзоциклических аминогрупп оснований образованием 2'-аминометил-4'-N-Trгетероциклических С морфолиновых нуклеозидов 3.89-3.93.

Base Base* Base* Base* \cap H_2N HO Br iii Ν Tr Tr Tr Τr 3.89-3.93 3.84-3.88 3.74-3.78 3.79-3.83 Base*= Ade^{Bz} Base*= Cvt^{Bz} Base*= Gua^{iBu} Base*=Ura Base*=Thy Base=Ura Base=Thy Base =Ade Base=Cvt Base=Gua 3.77 3.74 3.75 3.76 3.78 3.82 3.79 3.80 3.81 3.83 3.84 3.85 3.87 3.88 3.86 3.92 3.89 3.90 3.91 3.93

Схема 3.10. Синтез 2'-аминометил-4'-*N*-Тг-морфолиновых нуклеозидов. Реагенты (i) Ph₃P/CBrCl₃; (ii) NaN₃; (iii) 1) Ph₃P/Py, 2) конц. водн. NH₃.

Третьим этапом синтеза соединений **3.49-3.53** являлось детритилирование 2'-аминометил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов **3.89-3.93** при помощи 80 % водного раствора уксусной кислоты (v/v). Выход соединений 2'-аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов **3.49-3.53** составил 40-65 %.

3.2.3.2. Синтез конъюгатов АДФ серии **Па**

Серия **Па** основана на 2'-аминометилморфолиновых аналогах нуклеозидов, присоединенных 2'-аминометильной группой к β-фосфату АДФ через алифатическую линкерную группу, в сочетании с остатком щавелевой кислоты. Стоит отметить, что диметиловый эфир щавелевой кислоты, DMOX, и другие производные щавелевой кислоты широко и успешно используются как универсальные реагенты в синтезе модифицированных олигонуклеотидов [239-241] или миметиков нуклеиновых кислот [236]. Использование DMOX обеспечивает удобный подход для поэтапной селективной модификации соединений, содержащих алифатические аминогруппы.

Синтез конъюгатов **3.96-3.105** проводили в две стадии (Схема 3.11). На первой стадии осуществляли введение остатка щавелевой кислоты по алифатической аминогруппе соединений **3.25**, **3.26**. Синтез проводили путем обработки конъюгатов АДФ **3.25**, **3.26** диметиловым эфиром щавелевой

~ 77 ~

кислоты в присутствии Et₃N в DMSO в течение 2 суток. При этом происходила модификация алифатической аминогруппы полная без затрагивания ароматических аминогрупп с количественным образованием соединений 3.94, 3.95. На второй стадии конъюгаты АДФ 3.94, 3.95, содержащие остаток 2'эфира щавелевой обрабатывали монометилового кислоты аминометилморфолиновыми аналогами нуклеозидов 3.49-3.53 в присутствии Et₃N в DMSO в течение 2 суток. Реакция проходила селективно по первичной аминогруппе, затрагивая экзоциклические аминогруппы не гетероциклических оснований и атом азота морфолинового кольца. Целевые конъюгаты АДФ 3.96-3.105 получены с количественным выходом. Для анализа влияния «свободного» карбоксамидного остатка, помимо конъюгатов 3.94, 3.95 получены соединения 3.106, 3.108 и 3.107, 3.109, содержащие терминальные карбоксильную и карбоксамидную группы, соответственно.



Схема 3.11. Синтез конъюгатов АДФ серии **Па**. Реагенты: (i) DMOX; (ii) 3.49-3.53; (iii) водн. раствор. NaOH или конц. водн. NH₃/MeOH.

3.2.3.3. Синтез конъюгатов АДФ серии **Пб**

Серия ІІб (соединения 3.115-3.124) основана на 2'-аминометил-4'карбоксиметилморфолиновых аналогах нуклеозидов, присоединенных по βфосфату АДФ через алифатический аминолинкер. Синтез конъюгатов 3.115-3.124 осуществляли в несколько стадий (Схема 3.12). На первой стадии активацию карбоксильной группы 2'-N-Вос-аминометил-4'проводили карбоксиметилморфолиновых аналогах нуклеозидов 3.110-3.114 при помощи DCC и *N*-гидроксисукцинимида. Вторая стадия – реакция конденсации *N*гидроксисукцинимидных эфиров и конъюгатов АДФ 3.25, 3.26, содержащих алифатическую аминогруппу. На третьей стадии проводили удаление защитных групп по гетероциклическим основаниям морфолиновых нуклеозидов и промежуточную очистку конъюгатов. После удаления *N*-Восзащитной группы получали целевые конъюгаты 3.115-3.124.



Синтез 3.12. Синтез конъюгатов АДФ серии **Пб**. Реагенты: (i) DCC, HOSu; (ii) 3.25 или 3.26, 1М NaHCO₃/Na₂CO₃; (iii) конц. водн. NH₃; (iv) HCOOH.

3.3. Синтез соединений серии III

Третья серия миметиков НАД+ (III) основана на непосредственном связывании аденозина и морфолиновых аналогов нуклеозидов через

пирофосфатную связь. При этом серия III включает в себя два типа морфолиновых нуклеозидов: 2'-гидроксиметилморфолиновые (IIIa) и 2'аминометилморфолиновые (Шб). Так как при тестировании соединений серии Πб ферментативной системе ПАРП 1 В В качестве ингибиторов автополи(АДФ-рибозил)ирования наибольшую ингибирующую активность проявили соединения, содержащие остаток тимина (см. Раздел 3.4.2), мы расширить репертуар гетероциклических оснований решили ряда тимина/урацила в серии **III**. В случае урацильных производных мы предлагаем использование 5-галогенурацильных производных морфолиновых нуклеозидов в дополнение к природным гетероциклическим основаниям (Рис. 3.9).



Рисунок. 3.9. Общая структурная формула соединений серии III.

3.3.1 Синтез соединений серии IIIа.

На Рисунке 3.10 представлена ретросинтетическая схема синтеза пирофосфатов динуклеозидов **3.125-3.133** серии **Ша**. Синтез пирофосфатов **3.125-3.133** разделили на три синтетических этапа: 1) синтез 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов **3.74-3.78**, **3.141-3.143**; 2)

синтез монофосфорилированных производных **3.133-1.140**; 3) образование пирофосфатной связи.

Синтез 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов **3.74-3.78** подробно описан в Разделе 3.2.3.1. Поэтому первой задачей при синтезе соединений серии **Ша** являлся синтез 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов **3.141-3.143**.



Рисунок 3.10. Ретросинтетическая схема синтеза пирофосфатов динуклеозидов серии IIIa.

3.3.1.1. Синтез 5-галогенпиримидиновых производных 2'-гидроксиметил-4'-N-Tr-морфолиновых нуклеозидов

В литературе описан синтез 5-иодурацильного производного 2'гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолинового нуклеозида **3.141** [242]. Синтез основан на иодировании урацильного производного **3.74** в присутствии ICl/K₂CO₃. Позднее теми же авторами обнаружено, что при иодировании морфолинового производного цитозина с TBDPS защитной группой по 2'гидроксиметильной группе и 4'-*N*-Tr защитой, аналогично протоколу иодирования морфолинового производного урацила, происходит детритилирование морфолинового кольца [243]. Замена Tr защитой группы на иодирования способствовала получению ТFA-группу на стадии 5-2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолинового иодцитозинового производного нуклеозида. Теми же авторами предложено использование 5'-защищенных рибонуклеозидов, 5'-O-TBDPS, для получения 2'-гидроксиметил-4'-N-Trморфолиновых нуклеозидов [234]. Таким образом, предложенный авторами работ [234, 243] подход к синтезу 5-иодпиримидиновых производных 4'-N-Trморфолиновых нуклеозидов включает в себя ряд дополнительных стадий в связи с необходимостью введения и удаления временных TBDPS и TFA защитных групп. Увеличение количества стадий синтеза повлекло за собой использование дополнительных очисток.

Принимая во внимание вышеизложенное, нам представляется, что синтез 5-галогенпиримидиновых производных 2'-гидроксиметил-4'-N-Trморфолиновых нуклеозидов будет более простым, если в качестве исходных соединений использовать соответствующие 5-галогенпиримидиновые рибонуклеозиды, аналогично синтезу нуклеозидов 3.74-3.78 (Схема 3.9, Раздел 3.2.3.1). Следует отметить, что в литературе нет данных по методам синтеза 2'-гидроксиметил-4'-*N*-Tr-морфолиновых производных 5-5галогенпиримидиновых нуклеозидов соответствующих ИЗ галогенпиримидиновых рибонуклеозидов.

5-Иодуридин (**3.145**) и 5-иодцитидин (**3.146**) получены из уридина (**3.54**) и цитидина (**3.144**), соответственно, путем обработки элементарным иодом в присутствии иодноватой и уксусной кислот при 40 °C в течение 2 ч, согласно протоколу [244] (Схема 3.13). Выходы 5-иодуридина (**3.145**) и 5- иодцитидина (**3.146**) после хроматографической очистки не превышали 40 и 51 %, соотвественно. Низкие выходы объясняются присутствием исходных рибонуклеозидов в реакционной смеси. При увеличении времени реакции мы наблюдали образование дииодпроизводных (ВЭЖХ контроль).



Схема 3.13. Синтез 5-иодпиримидиновых рибонуклеозидов. Реагенты: I₂, HIO₃, AcOH, CCl₄/H₂O.

Синтез 5-иодпиримидиновых производных морфолиновых нуклеозидов 3.141 и 3.150 проводили в три стадии – периодатное окисление, образование основания Шиффа и восстановление (Схема 3.14). Наряду с соединениями 3.147 3.148 И наблюдалось образование значительного количества дегалогенированных побочных продуктов 3.69 и 3.149. Нами обнаружено, что процесс дегалогенирования происходит при восстановлении NaBH₃CN в кислых условиях (рН 3-4), при этом целевые соединения 3.141 и 3.150 получены с выходом 25 и 18 %, соответственно, после стадии тритилирования и хроматографической очистки (Схема 3.14 А). Если восстановление осуществлять при рН 5-6, побочных продуктов не образуется (Схема 3.14 Б). В этом случае соединения 3.141 и 3.150 получены с выходом 55 и 65 %, соответственно, после стадии тритилирования без хроматографических очисток.



Схема 3.14. Синтез 5-иодпиримидиновых производных морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) NaIO₄; (ii) (NH₄)₂B₄O₇·4H₂O, Et₃N; (iii) NaCNBH₃, (iv) CF₃COOH; (v) TrCl, Et₃N.

В связи с тем, что в процессе синтеза 5-пиримидиновых производных морфолиновых нуклеозидов **3.141** и **3.150** происходила реакция дегалогенирования, мы проверили устойчивость исходных иод содержащих нуклеозидов **3.145** и **3.146** в условиях восстановления при синтезе морфолиновых нуклеозидов в присутствии NaCNBH₃ в кислых условиях (pH 3-4). Как видно из Рисунка 3.11, в условиях реакции восстановления присутстановления поисходит полное деиодирование исходных соединений **3.145** и **3.146**.



Рисунок 3.11. ВЭЖХ-анализ взаимодействия 5-иодуридин и 5-иодцитидина с NaBH₃CN в кислых условиях (pH 3-4, 1 ч). (Условия ВЭЖХ см. Экспериментальную часть).

Мы полагаем, что необычное поведение 5-иодуридина 3.145 и 5иодцитидина 3.146 при взаимодействии с NaBH₃CN в кислых условиях (pH 3-4) объясняется присутствием не идентифицированных неорганических примесей в исходных 5-иодпиримидиновых нуклеозидах 3.145, 3.146, которые получены согласно протоколу [244]. В литературе описан метод иодирования гетероциклических оснований урацильных производных [245]. Метод основан на использовании церий(IV)-аммоний нитрата (CAN) в комбинации с I₂ или NaI. Мы провели синтез 5-иодуридина 3.145 согласно протоколу [245] (Схема 3.15). Синтез соединения 3.145 проводили в три стадии. На первой стадии получали полностью ацилированное по ОН-группам производное уридина **3.152**. Затем проводили иодирование гетероциклического основания соединения **3.152** под действием I_2 в присутствии САN при 80 °C в течение 30 мин. После очистки образовавшегося 5-иодурацильного производного 3.153 проводили деблокирование ацетильных защитных групп. Несмотря на необходимость введения и удаления временных ацетильных защитных групп, общий выход 5-иодуридина (**3.145**) из уридина (**3.54**) составил 89 %.



Схема 3.15. Синтез 5-иодуридина согласно протоколу [245]. Реагенты: (i) Ac₂O, Py; (ii) CAN, I₂, CH₃CN; (iii) конц. водн. NH₃.

5-Иодуридин **3.145**, синтезированный согласно протоколу [245] (Схема 3.15), оказался стабильным в условиях восстановления (NaBH₃CN при pH 3-4) при синтезе морфолинового производного **3.141** (Схема 3.14). Очистку соединения **3.141** проводили методом осаждения. Выход соединения **3.141** составил 56 %.

Поскольку метод иодирования [245] описан только для урацилсодержащих нуклеозидов, мы протестировали несколько способов синтеза 5-иодцитидина **3.146** в присутствии САN из различных производных 3.16). Нами 2',3',5'-триацетил-*N*⁴цитидина (Схема синтезированы 3.154 $2', 3', 5', N^4$ -тетраацетилцитидин бензоилцитидин И 3.155 ИЗ 3.144 (Схема 3.16). Соединение 3.154 соответствующего цитидина обрабатывали I2 и САМ в ацетонитриле при 80 °С. Через 14 ч реакция завершилась. После разделения продуктов реакционной смеси наряду с целевым соединением 3.156 мы выделили также соединение 3.153. В случае иодирования полностью ацетилированного цитидина 3.155 элементарным иодом в присутствии CAN в ацетонитриле или путем обработки NaI/CAN в уксусной кислоте при 80 °C мы наблюдали дезацетилирование и дезаминирование экзоциклической аминогруппы цитозина с образованием иодсодержащего уридина **3.153** в качестве единственного продукта. Иодирование незащищенного цитидина 4 в присутствии NaI/CAN в уксусной кислоте при 80 °C было более успешным. Выход 5-иодцитидина **3.146** после хроматографической очистки и осаждения составил 55 %.



Схема 3.16. Иодирование цитидина и его производных в присутствии САN. Peareнты: (i) 1)(Me)₃SiCl, Py, 2) BzCl, 3) NH₃/H₂O; (ii) Ac₂O, Py; (iii) CAN, I₂, CH₃CN; (iv) CAN, NaI, AcOH.

5-Иодцитидин **3.146**, полученный из цитидина **3.144** (Схема 3.16), стабилен в восстановительных условиях в синтезе морфолиновых производных нуклеозидов (NaBH₃CN при pH 3-4) при синтезе морфолинового производного **3.150** (Схема 3.14). Очистку соединения **3.150** проводили методом осаждения. Выход соединения **3.150** составил 65 %.

Синтез 5-бром- и 5-хлорурацильных производных морфолиновых нуклеозидов **3.142** и **3.143** осуществляли из соответствующих рибонуклеозидов **3.157** и **3.158** аналогично 5-иодпроизводному **3.141** (Схема 3.17). Очистку целевых соединений **3.142** и **3.143** проводили методом осаждения, выход составил 60 и 70 %, соответственно.



Схема 3.17. Синтез 5-хлор- и 5-бромурацильных производных морфолиновых нуклеозидов. Реагенты: (i) NaIO₄; (ii) (NH₄)₂B₄O₇·4H₂O, Et₃N; (iii) NaCNBH₃, CF₃COOH; (iv) TrCl, Et₃N

Таким образом, нами впервые синтезированы 5-галогенурацильные и 5иодцитидиновые производные морфолиновых нуклеозидов ИЗ соответствующих 5-галогенпиримидиновых нуклеозидов. Оптимизирован 5-иодпиримидиновых синтеза производных морфолиновых метод нуклеозидов исходя из особенностей поведения 5-иодуридина и 5иодцитидина, полученных различными способами, при действии NaCNBH₃ в кислых условиях. В дополнение к известному методу иодирования уридина в присутствии CAN [245], нами разработан аналогичный метод для цитидина. Предложенный нами метод синтеза 5-галогенпиримидиновых производных нуклеозидов морфолиновых содержит меньше стадий синтеза чем опубликованные ранее [234,242, 243], также метод легко ЭТОТ масштабировать.

3.3.1.2. Синтез 2'-О-метилмонофосфорилированных производных 4'-N-Trморфолиновых нуклеозидов

Следующим этапом в получении пирофосфатов динуклеозидов **3.125**-**3.132**, согласно ретросинтетической схеме (Рис. 3.10) являлся синтез 2'-*О*-метилмонофосфорилированных производных 4'-*N*-Tr-морфолиновых нуклеозидов **3.133-3.140**.

Монофосфорилирование 2'-гидроксиметильной группы защищенных морфолиновых производных нуклеозидов проводили под действием POCl₃ (3-4 экв.) в пиридине в течение 15 мин, при охлаждении на ледяной бане (Схема 3.18). По окончании реакции реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ. Целевые монофосфаты **3.133-3.140** выделяли экстракцией CH₂Cl₂. Выход монофосфатов составил 70-90 %.





3.3.1.3. Образование пирофосфатной связи между АМФ и 2'-Ометилмонофосфорилированными производными 4'-N-Tr-морфолиновых нуклеозидов

Синтез пирофосфатов динуклеозидов **3.125-3.132** осуществляли путем активации фосфатной группы 2'-*О*-метилмонофосфорилированных





Схема 3.19. Синтез соединений серии IIIа. Реагенты: (i) Ph₃P/(PyS)₂, *N*-MeIm; (ii) 1) AMФ, 2) конц. водн. NH₃, (iii) 80 % водн. AcOH.

Реакцию активации соединений **3.133-3.140** проводили аналогично активации 5'-монофосфата 3'-азидотимидина, подробно описанной в *Главе 3.1.2. N*-Метилимидазолидные производные **3.159-3.166** использовали *in situ* в

реакции с *н*-Ви₃NH⁺ солью АМФ **3.2**. Очистку соединений **3.167-3.174** проводили методом ОФХ. Реакцию детритилирования осуществляли путем обработки соединений **3.167-3.174** 80 % водн. раствором AcOH (v/v). Пирофосфаты **3.125-3.132** выделяли осаждением 4 % NaClO₄/ацетон. Общий выход пирофосфатов **3.125-3.132** составил 70-80 %.

3.3.2 Синтез соединений серии IIIб.

Как сказано ранее, третья серия (III) основана на непосредственном связывании аденозина и морфолиновых нуклеозидов через пирофосфатную связь. При этом соединения серии ІІІб содержат в своей структуре фосфамидную связь, образованную между ΑДΦ (3.175)И 2'аминометилморфолиновыми аналогами нуклеозидов (3.89, 3.90, 3.176-3.179). В качестве исходных соединений в синтезе серии Шб использовали морфолиновые нуклеозиды, содержащие защитные группы ПО гетероциклических Trэкзоциклическим аминогруппам оснований И защитную группу по морфолиновому атому азота. В случае соединений 3.89, 3.90, 3.179 защитные группы не требуются, поэтому синтез тимин-, урацил- и 5-иодурацилсодержащих производных 2'-аминометилморфолиновых нуклеозидов 3.89, 3.90, 3.179 осуществляли согласно Схеме 3.10 (см. Раздел 3.2.2.1). Следует отметить, синтезу 2'-ЧТО ЭТОТ подход К аминометилморфолинового нуклеозида 3.179 не является оптимальным, поскольку выход целевого соединения составил 5 %. Синтез морфолиновых нуклеозидов 3.176-3.178 проводили с некоторыми модификациями относительно Схемы 3.10. С целью сохранения защитных групп по соединений 3.176-3.178 гетероциклическим основаниям на стадии восстановления азидогруппы до аминогруппы использовали Ph₃P в пиридине с последующей обработкой водным раствором NaOH (Схема 3.20).



Схема 3.20. Синтез 2'-аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов 3.176-3.178. Реагенты (i) Ph₃P, Py; (ii) водн. NaOH.

Концевой фосфат АДФ (**3.175**) активировали путем обработки *н*-Ви₃NH⁺ соли АДФ (3.175) редокс-парой Ph₃P/(PyS)₂ в присутствии избытка N-MeIm, при этом образовался интермедиат 3.180. Затем к реакционной смеси добавляли аминопроизводные нуклеозидов 3.89, 3.90, 3.176-3.179. После окончания реакции конденсации к реакционной смеси добавляли, в случае необходимости, конц. водн. NH₃ для деблокирования гетероциклических оснований. Очистку конъюгатов 3.181-3.186 (Схема 3.21), содержащих N-Trзащитную группу, проводили методом ОФХ. Детритилирование соединений 3.181-3.186 осуществляли обработкой 80 % АсОН. По завершении реакции, смесь осаждали 4 % раствором NaClO₄/ацетон. В результате получены целевые пирофосфаты 3.187-3.192, содержащие своей В структуре фосфамидную связь.



Схема 3.21. Синтез соединений серии Шб. Реагенты: (i) Ph₃P/(PyS)₂, *N*-MeIm; (ii) 3.89, 3.90, 3.176-3.179; (iii) конц. водн. NH₃; (iv) 80 % AcOH.

3.4. 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 аналогично протоколу [12]. 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.

3.4.1. Серия I

Из данных Рисунка 3.12 видно, что единственным соединением серии I, проявившим ингибирующую активность в отношении ПАРП 1, оказалось соединение **3.30**, включающее в себя остатки 2-(2-аминоэтокси)этанола и 3-аминобензойной кислоты, IC₅₀ 480 ± 180 мкМ. Для соединений, включающих в себя остатки никотиновой (**3.28** и **3.45**), *изо*-никотиновой (**3.27** и **3.46**), 6-гидроксиникотиновой (**3.29** и **3.48**), 3-аминобензойной (**3.30** и **3.44**) и 2-метоксибензойной (**3.31** и **3.47**) кислот показано отсутствие ингибирующей активности в отношении ПАРП 1 при укорочении линкерной группы.



Рисунок 3.12. Остаточная активность ПАРП 1 в присутствии 0.5 мМ ингибиторов серии I

Согласно данным Таблицы 3.1, наиболее активным соединением серии **Па** является соединение **3.98** (IC₅₀ = 123 ± 51.0 мкМ), включающее в себя остаток аденинсодержащего морфоливоного нуклеозида, при этом показано отсутствие ингибирующей активности в отношении ПАРП 1 при укорочении линкера (соединения **3.98** и **3.103**). Стоит отметить, что урацильное производное **3.96** умеренно ингибирует ПАРП 1 (IC₅₀ = 355.0 ± 78.0 мкМ), и, аналогично адениновым производным (соединения **3.98** и **3.103**), при укорочении линкерной группы наблюдается отсутствие ингибирующей активности в отношения **3.98** и **3.103**).

Таблица 3.1. Ингибирующий эффект соединений серии **Па** в отношении ПАРП 1.

Общая структурная формула соединений серии Па						
$\begin{array}{c} OH OH \\ Ade \end{array} \begin{array}{c} O^{-} & O \\ O \\ -P \\ -O \\ -P \\ O \\ 0 \end{array} \begin{array}{c} O^{-} \\ -P \\ -O \\ -P \\ O \\ 0 \end{array} \begin{array}{c} O^{-} \\ -P \\ -O \\ -P \\ O \\ -O \\ -P \\ O \end{array} \begin{array}{c} O \\ -NH \\ O \\ -O \\ X \end{array} \begin{array}{c} O \\ -NH \\ O \\ X \end{array}$						
HO NH ₂ HO NH						NH ₂
N⁰	X		Соед.	IC ₅₀ ,	Соед.	IC ₅₀ , мкМ
				мкМ		
1	~OMe		3.94	>1000	3.95	>1000
2	~OH		3.106	>1000	3.108	>1000
3	~NH ₂		3.107	>1000	3.109	>1000
4		Ura	3.96	355.0±78.0	3.101	>1000
5		Thy	3.97	>1000	3.102	>1000
6	H N	Ade	3.98	123.0±51.0	3.103	>1000
7	Н	Cyt	3.99	>1000	3.104	>1000
8	Base =	Gua	3.100	>1000	3.105	>1000

При анализе серии **II6** показано, что наиболее активными соединениями этой серии являются соединения **3.116** (IC₅₀ = 41.5 ± 3.5 мкМ) и **3.121** (IC₅₀ = 64.0 ± 11.0 мкМ), включающие в себя остаток тиминсодержащего морфолинового нуклеозида (Таблица 3.2). Следует отметить, что при укорочении линкерной группы эффективность ингибирования ПАРП 1 несколько уменьшалась аналогично сериям **I** и **IIa** (см. Рисунок 3.12 и Таблица 3.1).

Таблица 3.2. Ингибирующий эффект соединений серии **Пб** в отношении ПАРП 1.

Общая структурная формула соединений серии Пб						
$H_2N \xrightarrow{N} H_2N						
HONH2			HONH ₂			
N⁰	Base	Соед.	IC ₅₀ ,	Соед.	IC ₅₀ ,	
			мкМ		мкМ	
1	Ura	3.115	720.0 ± 230.0	3.120	>1000	
2	Thy	3.116	41.5 ± 3.5	3.121	64.0±11.0	
3	Ade	3.117	>1000	3.122	>1000	
4	Cyt	3.118	>1000	3.123	>1000	
5	Gua	3.119	>1000	3.124	1020.0 ± 120.0	

В отличие от соединений серии **Па** самыми активными соединениями серии **Пб** оказались тиминсодержащие нуклеозиды независимо от длины линкерной группы. 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.

3.4.3. Серия III

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

Из данных Таблицы 3.3 видно, что наиболее активным соединением серии III в отношении ПАРП 1 оказалось соединение 3.192 (IC₅₀ = 126 ± 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 3.130 (IC₅₀ = 255 ± 5 мкМ). На том же уровне подавляет активность фермента тиминовое производное с фосфамидной связью в структуре: 3.188 (IC₅₀ = 220 ± 50 мкМ). Кислородсодержащий аналог последнего подавляет активность ПАРП 1 всего на 60 % в 1 мМ концентрации. Аденозиновое производное 3.189 с фосфамидной связью в структуре также умеренно ингибирует ПАРП 1 (IC₅₀ = 353 ± 4 мкМ) в отличие от кислородсодержащего аналога 3.127.

Общая структурная формула соединений серии III								
ОН ОН								
			0 0	N H				
X=O				X=NH				
N⁰	Base	Соед.	Остаточная	Соед.	Остаточная			
			активность ПАРП 1,		активность ПАРП 1,			
			%, в присутствии 1		%, в присутствии 1			
			мМ ингибиторов		мМ ингибиторов			
			или IC ₅₀ , мкМ*		или IC ₅₀ , мкМ*			
1	Ura	3.125	93.0 ± 9.9 %	3.187	$89\pm26~\%$			
2	Thy	3.126	40 ± 20 %	3.188	220 ± 50 мкМ			
3	Ade	3.127	80 ± 14 %	3.189	353 ± 4 мкМ			
4	Cyt	3.128	96.0 ± 2.8 %	3.190	87.5 ± 7.8 %			
5	Gua	3.129	45.5 ± 3.5 % 3.191 74		74 ± 21 %			
6	5-I-Ura	3.130	255 ± 5 мкМ	3.192	126 ± 6 мкМ			
7	5-Br-Ura	3.131	36.0 ± 8.5 %					
8	5-Cl-Ura	3.132	57.5 ± 7.8 %					

Таблица 3.3. Ингибирующий эффект соединений серии **III** в отношении ПАРП 1.

*Значения IC₅₀ приведены для тех соединений, в присутствии которых активность ПАРП 1 не превышала 30 %.

При анализе ингибирующей активности соединений серии III в отношении ПАРП 2 видно, что самым активным соединением является соединение **3.189** (IC₅₀ = 63 ± 10 мкМ), включающее в себя остаток аденин-2'-аминометилморфолинового нуклеозида (Таблица 3.4). Влияние типа связывания с молекулой АДФ на ингибирующие свойства соединений в случае ПАРП 2 более выражено, чем для ПАРП 1 (сравнение пар тимин- и аденозинсодержащих производных). Исключение составляют 5-

иодурацилсодержащие производные **3.130** и **3.192**, которые ингибируют ПАРП 2 одинаково независимо от типа связывания с молекулой АДФ.

Таблица 3.4. Ингибирующий эффект соединений серии **Ш** в отношении ПАРП 2.

Общая структурная формула соединений серии III							
ОН ОН							
Ade O O O O O O Ade O O O O O O O O O O O O O O O O O O O							
			X=O	X=NH			
N⁰	Base	Соед.	Остаточная	Соед.	Остаточная		
			активность ПАРП 2,		активность ПАРП 2,		
			%, в присутствии 1		%, в присутствии 1		
			мМ ингибиторов или		мМ ингибиторов		
			IC ₅₀ , мкМ*		или IC ₅₀ , мкМ*		
1	Ura	3.125	67 ± 4 %	3.187	33 ± 5 %		
2	Thy	3.126	474 ± 14 мкМ	3.188	136 ± 2 мкМ		
3	Ade	3.127	421 ± 6 мкМ	3.189	63 ±10 мкМ		
4	Cyt	3.128	66.0 ± 8.5 % 3.190		34.5 ± 0.7 %		
5	Gua	3.129	34 ± 18 %	3.191	224 ± 24 мкМ		
6	5-I-Ura	3.130	160 ± 10 мкМ	3.192	110 ± 4 мкМ		
7	5-Br-Ura	3.131	474 ± 71 мкМ				
8	5-Cl-Ura	3.132	46.8 ± 9.5 %				

*Значения IC₅₀ приведены для тех соединений, в присутствии которых активность ПАРП 1 не превышала 30 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен новый класс соединений в качестве ингибиторов ПАРП 1 АДФ, потенциальных производные модифицированные по β-фосфату. Предлагаемые нами соединения являются миметиками НАД+, их отличительной особенностью от уже существующих ингибиторов ПАРП [9] является наличие в структуре двух значимых структурных элементов молекулы НАД+ – аденозинового и пирофосфатного фрагментов. В никотинамидрибозидного качестве 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+ оптимизирован метод образования пирофосфатной связи для синтеза нуклеозид-5'-дифосфатов, содержащих линкерную группу по концевому фосфату, и динуклеозид пирофосфатов. Мы полагаем, что применение этого метода возможно расшить для образования полифосфатных производных нуклеозидов и их аналогов. Разработан универсальный подход к синтезу двух серий производных АДФ, основанный на использовании общего соединенияпредшественника – 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 галогенированных 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+ в ферментативной системе ПАРП 1 обнаружено, что эти соединения являются умеренными ингибиторами ПАРП 1, IC₅₀ 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.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Материалы и методы

В работе использованы следующие реактивы: *N*-гидроксисукцинимид, трифторуксусной 4'этиловый эфир кислоты, DCC. монометоксифенилдифенилметилхлорид, трифенилметилхлорид, тетраборат аммония, N,N'-диметилимидазолидинон-2, динатриевая соль аденозин-5'монофосфата (Aldrich, США), 2-(2-аминоэтокси)этанол, диметилоксалат (Acros, США), 9-флуоренилметилоксикарбонилхлорид, периодат натрия, трифенилфосфин (Fluka Chemie, Швейцария), уридин, тимидин, цитидин (ChemGenes Corporation, США), хлорокись фосфора, *N*-метилимидазол (Merck, Германия), цианоборгидрид натрия (Alfa Aesar, Германия), 5-Венгрия), 2,2'-дитиодипиридин бромуридин (Reanal. (Fluorochem, N^4 -бензоилцитидин, N^2 -Великобритания), N^{6} -бензоиладенозин, изобутирилгуанозин (НаноТех-С, Россия). Соединения 3.15 3.26 И синтезированы аналогично методике [230]. 2'-N-Вос-аминометил-4'карбоксиметилморфолиновые нуклеозиды 3.110-3.114 синтезированы согласно [246]. 2'-Аминометил-4'-N-Tr-морфолиновые нуклеозиды 3.74-3.78, 3.176-3.178 синтезированы как описано в работе [236, 237]. 5-Хлоруридин (3.158) синтезировали согласно методике [245]. Остальные реактивы и Перед растворители отечественного производства. использованием растворители очищали стандартными методами, в случае необходимости.

Анализы реакционных смесей методом ВЭЖХ проводили на приборе Милихром А-02 (Эконова, Россия), колонка 2 × 75 мм, сорбент ProntoSIL 120-5-С18, в градиенте концентрации буфера Б (0.1 М Et₃N-AcOH, pH 7.0, 80 % водный MeCN) в буфере А (0.1 М Et₃N-AcOH, pH 7.0, вода), с регистрацией УФ-поглощения в процессе хроматографии при 250, 260, 280 и 300 нм. Количественную обработку хроматографических данных проводили с использованием программного пакета МультиХром 1.5х-Е (Амперсенд, Москва; Эконова, Новосибирск). ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Кіеselgel 60 F254 (Мегск, Германия) в подходящих системах растворителей (см. ниже); продукты визуализировали с помощью УФ-облучения ($\lambda = 254$ нм), 0.1 % раствора нингидрина в бутаноле (аминогруппы), 0.25 % раствора цистеина в 30 % водной H₂SO₄ (рибонуклеозиды и тритильные производные). Упаривание растворов проводили при пониженном давлении при температуре 40 °C при помощи роторного испарителя RE-51 (Yamato, Япония) или вакуумного концентратора Speed Vak (Savant, США). Обращенно-фазовую колоночную хроматографию проводили с использованием RP C-18 (55–105 мкм, 125A, Waters, США). Анионообменную хроматографию проводили с использованием DEAE-сефадекса A-25 (Pharmacia, Швеция). Состав элюентов указан в объемных процентах.

Спектры ¹Н-, ¹³С-, ³¹Р- и ¹⁹F-ЯМР регистрировали на приборах Bruker AV300, AV400 или DRX500 (Германия) при 30 °С в подходящих дейтерированных растворителях. Значения химических сдвигов (δ) представлены в м. д. по отношению к сигналам ТМS, для спектров ЯМР ¹Н и 13 С, и С₆F₆ для спектров ЯМР 19 F. В случае спектров ЯМР 31 Р в качестве 80 H_3PO_4 . Константы стандарта использовали % спин-спинового взаимодействия (J) измерены в герцах. Спектры записаны в центре коллективного пользования по органических анализу соединений и материалов НИОХ СО РАН.

Масс-спектры регистрировали масс-спектрометров с помощью "Autoflex III" (Bruker Daltonics, Inc.) 2.5с использованием дигидроксибензойной кислоты в качестве матрицы (MALDI-TOF) и Agilent Technologies ESI MSD XCT Ion Trap (США) (ESI) в центре массспектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН.

4.2.1. Общая методика образования пирофосфатной связи в фосфатных производных нуклеозидов, на примере синтеза 5',5'-пирофосфата аденозина и 3'-азидотимидина

Приготовление *н*-Ви₃NH⁺ соли АМФ (3.2)

Динатриевую соль АМФ (1.5 ммоль, 0.6 г) растворяли в 20 % EtOH/H₂O (30 мл). Полученный раствор пропускали через колонку с Dowex 50Wx2 в пиридиниевой форме (30 мл). Колонку промывали 20 % EtOH/H₂O (50 мл). Фракции, содержащие целевой нуклеотид, упаривали с добавлением *н*-Bu₃N (4.5 ммоль, 1.1 мл). Остаток сушили путем соупаривания с MeCN (2×10 мл) и толуолом (3×10 мл), затем под вакуумом. *н*-Bu₃NH⁺ соль АМФ получена с количественным выходом в виде белого гигроскопичного порошка (1.5 ммоль, 0.8 г).

Синтез 5'-монофосфата 3'-азидо-2',3'-дидезоксириботимидина (соединение 3.5, Схема 3.2)

3'-Азидотимидин **3.3** (0.8 ммоль, 216 мг) растворяли в пиридине (4 мл). Раствор охлаждали до -15 °С. К полученному раствору при охлаждении и интенсивном перемешивании добавляли POCl₃ (3.2 ммоль, 0.3 мл). Реакцию проводили в течение 15 мин при охлаждении. Затем реакционную смесь добавляли к раствору 1 М ТЭАБ (40 мл), pH 7.5, раствор перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь упаривали. Остаток после упаривания растворяли в 0.1 М ТЭАБ (1 мл) и наносили на колонку с RP C-18 (колонка 1.8×17 см). Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации этанола (0—5 %) в 0.1 М NH₄HCO₃. Общий объем элюента 200 мл. Фракции, содержащие целевой монофосфат **3.5**, упаривали. *н*-Ви₃NH⁺ соли АМФ **3.2**. Выход монофосфата **3.5** составил 80 % (0.64 ммоль). R_f 0.34 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (DMSO-d6): 7.80 (1H, с, H6-Thy), 6.14 (1H, т, *J* 6.7, H1'), 4.52-4.42 (1H, м, *J* 6.7, H4'), 3.99-3.85 (2H, м, H5'), 2.82-2.74 (1H, м, H3'), 2.33-2.20 (2H, м, H2'), 1.8 (3H, с, CH₃-Thy); ³¹Р-ЯМР (DMSO-d6): 1.35 (с).

Синтез (3'-азидо-2',3'-дидезоксириботимидин-5'-*O*)-β-дифосфо-5'-*O*аденозина (соединение 3.1, Схемы 3.1 и 3.2)

Способ 1. Синтез соединения 3.1 согласно Схеме 3.1

З'-Азидотимидин 3.3 (0.2 ммоль, 53 мг) растворяли в триметилфосфате (1 мл) с добавлением н-Ви₃N (0.6 ммоль, 0.145 мл). Полученный раствор охлаждали на ледяной бане и при перемешивании добавляли POCl₃ (0.24 ммоль, 0.023 мл). Контроль за ходом реакции осуществляли путем растворения пробы реакционной смеси в воде. При гидролизе реакционной смеси образовывался монофосфат **3.5**, анализ на TCX, $R_f 0$ (EtOH–CH₂Cl₂, 1:9), R_{f} 0.33 (*i*PrOH–конц. аммиак–Н₂О, 7:1:2). Реакцию водн. монофосфорилирования проводили в течение 30 мин при охлаждении на ледяной бане. Отдельно готовили раствор *н*-Ви₃NH⁺ соли АМФ **3.2** (0.6 ммоль) в триметилфосфате (1.2 мл) с добавлением *н*-Ви₃N (0.6 ммоль, 0.145 мл). К раствору АМФ добавляли реакционную смесь монофосфорилирования соединения 3.3 при охлаждении. Реакционную смесь выдерживали в течение ночи. Реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ рН 7.5 (5 мл), раствор перемешивали в течение часа. Затем реакционную смесь упаривали. Остаток после упаривания растворяли в 20 % EtOH/H₂O (v/v) и наносили на колонку с DEAE Молселект А-25 (1.8×15 см). Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 \rightarrow 0.5 M) в 20 % EtOH/H₂O. Общий объем элюента 400 мл. Фракции, содержащие целевой пирофосфат 3.1, упаривали. Остаток растворяли в 0.1 М NH₄HCO₃ и дополнительно очищали с помощью ОФХ (колонка 1.8×15 см) в линейном градиенте концентрации этанола (0→15 %) в 0.1 М NH₄HCO₃. Общий объем элюента 200 мл. Фракции, содержащие целевое соединение 3.1, упаривали. Продукт 3.1 растворяли в воде (2 мл) и осаждали добавлением 4 % NaClO₄ в ацетоне (20 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, затем промывали ацетоном и сушили на воздухе. Выход соединения **3.1** составил 25 % (0.05 ммоль).

Способ 2. Синтез соединения 3.1 согласно Схеме 3.2

н-Ви₃NH⁺ соль 5'-монофосфата 3'-азидотимидина **3.5** (0.02 ммоль) растворяли в DMI (0.2 мл). К раствору нуклеотида добавляли Ph₃P (0.06 ммоль, 16 мг), (PyS)₂ (0.06 ммоль, 13 мг) и *N*-MeIm (0.24 ммоль, 0.02 мл). Контроль за ходом реакции осуществляли путем растворения пробы реакционной смеси в 20 % растворе морфолина в EtOH (v/v) и анализе на TCX (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2). Полноту протекания реакции оценивали по исчезновению исходного монофосфата **3.5**. Реакцию активации проводили в течение 15 мин. В результате реакции образовывался *N*-метилимидазолид **3.6**.

В случае использования интермедиата **3.6** *in situ*, к реакционной смеси реакции активации добавляли раствор *н*-Ви₃NH⁺ соли АМФ **3.2** (0.08 ммоль) в DMI (0.2 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре.

В случае использования интермедиата **3.6** *после выделения* из реакционной смеси, реакционную смесь реакции активации осаждали добавлением Et_2O (20 мл). Суспензию охлаждали (1 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, затем промывали Et_2O . К осадку добавляли раствор *н*-Вu₃NH⁺ соли АМФ **3.2** (0.03 ммоль) в DMI (0.2 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Через час, как в случае с выделением, так и в случае использования интермедиата **3.6** *in situ*, реакционную смесь осаждали добавлением Et_2O (20) -20 (1 °C), мл). Суспензию охлаждали ч. осадок отделяли центрифугированием, затем промывали Et₂O. Осадок растворяли в воде (0.5 мл) и наносили на колонку с RP C-18 (1.8×18 см). Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации этанола ($0 \rightarrow 5$ %) в 0.1 М NH₄HCO₃. Общий объем элюента 200 мл. Фракции, содержащие целевой продукт 3.1, упаривали. Пирофосфат 3.1 растворяли в воде (0.3 мл) и осаждали добавлением 4 % раствора NaClO₄ в ацетоне (3 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, затем промывали ацетоном и сушили на воздухе. Выход соединения **3.1** составил 80 % (0.016 ммоль). R_f 0.48 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (D₂O): 8.37 (1H, c, H2-Ade), 8.09 (1H, c, H8-Ade), 7.74 (1H, уш.с., H6-Thy), 6.02-5.96 (2H, м, H1'-rA, H1'-dT(N₃)), 4.66 (1H, уш.т, *J* 5.4, H4'-dT(N₃)), 4.47 (1H, уш.т, *J* 4.4, H4'-rA), 4.31 (1H, уш.с., H2'-rA), 4.27-4.12 (4H, м, H5'-rA, H5'-dT(N₃)), 4.11-3.99 (4H, м, H3'-rA, H3'-dT(N₃)), 2.26-2.18 (2H, м, H2'-dT(N₃)), 1.71 (3H, c, CH₃- dT(N₃)); ¹³C-ЯМР (D₂O): 165.79, 160.42, 154.86, 152.16, 150.79, 148.44, 136.74, 117.97, 110.79, 86.55, 84.23, 83.34 (д, *J_{CP}* 8.5), 82.70 (д, *J_{CP}* 8.2), 74.09, 69.96, 65.12 (д, *J_{CP}* 4.6), 64.92 (д, *J_{CP}* 3.5), 49.62, 37.02, 11.34; ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.69 – (-11.25) (м); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₀H₂₅N₁₀O₁₃P₂⁻ вычислено 675.11, найдено 675.00, [M-2H+Na]⁻ C₂₀H₂₄N₁₀NaO₁₃P₂⁻ вычислено 697.09, найдено 697.00.

4.2.2. Синтез конъюгатов АДФ с аминолинкером

2-(2-*N*-(трифенилметил)аминоэтокси)этанол (соединение 3.10, Схема 3.3)

2-(2-Аминоэтокси)этанол (**3.8**) (3 ммоль, 0.30 мл) растворяли в DMF (3 мл) с добавлением Et₃N (3 ммоль, 0.42 мл). К полученному раствору порционно в течение 3 ч добавляли TrCl (0.3 ммоль, 0.84 г). По окончании реакции к реакционной смеси по каплям добавляли 5 % водный раствор NaHCO₃. Затем реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂ (30 мл) и промывали водой (30 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Продукт **3.10** очищали хроматографией на силикагеле. Элюцию вели в ступенчатом градиенте концентрации ацетона (0 \rightarrow 25 %) в CH₂Cl₂, с шагом 5 %. Фракции анализировали методом TCX. Фракции, содержащие целевое соединение, упаривали и сушили под вакуумом. Выход соединения **3.10** составил 77 % (2.3 ммоль, 0.8 г). R_f 0.40 (CH₂Cl₂–EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.48 (6H, дт, *J* 7.7, 1.6, *H*-Ar), 7.28 (6H, тт, *J* 7.3, 1.9, *H*-Ar), 7.19 (3H, тт, *J* 7.2, 1.4, *H*-Ar), 3.70 (2H, т, *J* 4.7, *CH*₂OH), 3.62 (2H, т, *J* 5.3, NHCH₂*CH*₂O),
3.50 (2H, т, *J* 4.7, OCH₂CH₂O), 2.37 (2H, т, *J* 5.3, NHCH₂CH₂O); ¹³С-ЯМР (ацетон-d6): 146.19, 128.45, 127.49, 125.95, 72.21, 70.54, 70.34, 60.83, 43.17.

2-[2-*N***-**((**4**-монометоксифенил)дифенилметил)аминоэтокси]этанол (соединение **3.11** Схема **3.3**). Синтез соединения **3.11** осуществляли аналогично соединению **3.10** исходя из 2-(2-аминоэтокси)этанола (**3.8**) и MMTrCl. Выход соединения **3.11** составил 85 % (5.1 ммоль, 1.90 г). *R_f* 0.38 (MeOH–CH₂Cl₂, 0.5:9.5); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.47 (4H, дт, *J* 7.4, 1.5, *H*-Ar), 7.39 (2H, дт, *J* 8.9, 2.1, *H*-Ar), 7.28 (4H, тт, *J* 7.1, 1.4, *H*-Ar), 7.19 (2H, тт, *J* 7.3, 1.5, *H*-Ar), 6.82 (2H, дт, *J* 8.9, 1.9, *H*-Ar), 3.78 (3H, с, *CH*₃O), 3.70 (2H, уш.т, *J* 4.6, *CH*₂OH), 3.62 (2H, т, *J* 5.4, O*CH*₂CH₂O), 3.50 (2H, уш.т, *J* 4.8, NHCH₂*CH*₂O), 2.38 (2H, т, *J* 5.3, NH*CH*₂); ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 157.96, 146.34, 138.24, 129.92, 128.67, 127.93, 126.34, 72.02, 71.39, 70.35, 61.92, 55.28, 43.45.

2-(2-*N*-(трифторацетил)аминоэтокси)этанол (соединение 3.17 Схема 3.5)

2-(2-Аминоэтокси)этанол (**3.8**) (5 ммоль, 0.5 мл) растворяли в метаноле (5 мл) с добавлением Et₃N (5 ммоль, 0.7 мл). К полученному раствору добавляли раствор этилового эфира трифторуксусной кислоты (6 ммоль, 0.45 мл) в метаноле (2.5 мл). Через 3 ч реакционную смесь упаривали. Продукт **3.17** очищали хроматографией на силикагеле. Элюцию вели в ступенчатом градиенте концентрации метанола (0 \rightarrow 10 %) в CH₂Cl₂, с шагом 5 %. Фракции анализировали методом TCX. Фракции, содержащие целевое соединение, упаривали и сушили под вакуумом. Выход соединения **3.17** составил 80 % (4 ммоль, 0.8 г). R_f 0.6 (EtOH-CH₂Cl₂, 1:9); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.78 (1H, уш.с, NH), 3.72 (2H, т, *J* 4.4, *CH*₂OH), 3.62-3.49 (6H, м, O*CH*₂CH₂O, NHCH₂*CH*₂O, NH*CH*₂), 3.22 (1H, уш.с, OH); ¹³C-ЯМР CDCl₃): 157.75 (кв, *J_{CF}* 37.4, C=O), 116.00 (q, *J_{CF}* 287.2, CF₃), 72.04, 68.68, 61.36, 39.63; ¹⁹F-ЯМР (CDCl₃) 85.81.

Общая методика монофосфорилирования *N*-защищенных аминоспиртов в пиридине с POCl₃

N-защищенный аминоспирт (**3.10**, **3.11**, **3.15** или **3.17**) (1 ммоль) сушили соупариванием с пиридином (3×3 мл). Остаток после упаривания растворяли

в пиридине (10 мл), полученный раствор охлаждали на ледяной бане. К раствору *N*-защищенного аминоспирта добавляли POCl₃ (4 ммоль, 0.374 мл). Через 15 мин реакционную смесь разлагали 1 М ТЭАБ (100 мл), pH 7.5.

В случае монофосфорилирования соединения **3.10** через 1 час после разложения к реакционной смеси добавляли CH_2Cl_2 (20 мл). Органический слой отделяли и промывали водой (2×20 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 с добавлением Et_3N (9.5:0.5, 1 мл) и осаждали добавлением петролейного эфира (10 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, затем промывали петролейным эфиром и сушили под вакуумом. Соединение **3.12** получено в виде Et_3NH^+ соли с выходом 75 % (0.75 ммоль).

В случае монофосфорилирования соединения **3.11** спустя 1 ч после разложения реакционную смесь упаривали. Продукты реакции разделяли методом AOX в линейном градиенте концентрации ТЭАБ (0 \rightarrow 0.6 M) в 40 % EtOH/H₂O. Общий объем элюента 1 л. Полностью деблокированный монофосфат **3.14** получен в виде Et₃NH⁺ соли с выходом 40 % (0.4 ммоль).

В случае монофосфорилирования соединения **3.15** спустя 1 ч после разложения реакционную смесь упаривали. Продукты реакции разделяли методом ОФХ в линейном градиенте концентрации MeCN (0 \rightarrow 50 %) в 0.05 М ТЭАБ. Общий объем элюента 1 л. Полностью деблокированный монофосфат **3.14** получен в виде Et₃NH⁺ соли с выходом 55 % (0.55 ммоль).

В случае монофосфорилирования соединения **3.17** спустя 1 ч после разложения реакционную смесь упаривали. Продукты реакции разделяли методом ОФХ в 0.1 М ТЭАБ. Фракции, содержащие целевой монофосфат **3.18**, упаривали и высушивали под вакуумом. Монофосфат **3.18** получен в виде Et₃NH⁺ соли с выходом 80 % (0.8 ммоль).

2-(2-*N***-(трифенилметил)аминоэтокси)этилфосфат (соединение 3.12,** Схема 3.3). R_{*f*} 0.33 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.47 (6H, дт, *J* 7.1, 1.7, *H*-Ar), 7.26 (6H, тт, *J* 7.7, 1.9, *H*-Ar), 7.17 (3H, тт, *J* 7.2, 2.1, *H*-Ar), 3.99 (2H, дт, *J* 6.8, 5.2, *CH*₂OP), 3.62- (4H, м, OCH₂CH₂O, NHCH₂*CH*₂O), 3.47 (1H, т, *J* 5.0, NH), 2.99 (6H, кв, *J* 7.3, *CH*₂-Et₃N), 2.31 (2H, т, *J* 5.3, NH*CH*₂CH₂O), 1.27 (9H, т, *J* 7.3, *CH*₃-Et₃N); ¹³C-ЯМР (DMSO-d6+ацетонd6): 146.00, 128.29, 127.53, 125.93, 70.35 (д, *J*_{*CP*} 8.3), 70.25, 70.06, 62.91 (д, *J*_{*CP*} 5.3), 45.11, 43.05, 8.84; ³¹P-ЯМР (CDCl₃): 1.57 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₃H₂₅NO₅P вычислено 426.148, найдено 426.195, [2M-H]⁻ C₄₆H₅₁N₂O₁₀P₂⁻ вычислено 853.302, найдено 853.089.

2-(2-Аминоэтокси)этилфосфат (соединение 3.14, Схема 3.3 или 3.4). ¹H-ЯМР (CD₃CN–D₂O, 1:1): 4.45-4.38 (2H, м, *CH*₂OP), 4.24-4.13 (4H, м, O*CH*₂CH₂O, NH₂CH₂*CH*₂O), 3.65-3.56 (10H, м, NH₂*CH*₂, *CH*₂(Et₃N)), 1.71 (15H, т, *J* 7.3, *CH*₃(Et₃N)); ¹³C-ЯМР (CD₃CN–D₂O, 1:1): 71.21 (д, *J*_{*CP*} 6.86), 67.23, 65.18 (д, *J*_{*CP*} 5.14), 47.52, 40.1, 9.17; ³¹P-ЯМР (CD₃CN–D₂O, 1:1): 1.58 (с).

2-(2-*N*-(**Трифторацетил**)аминоэтокси)этилфосфат (соединение 3.18, Схема 3.5). R_f 0.63 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (D₂O): 4.01-3.94 (2H, м, *CH*₂OP), 3.72 (4H, уш.т, *J* 5.1, O*CH*₂CH₂OP, NHCH₂*CH*₂O), 3.55 (2H, т, *J* 5.2, NH*CH*₂), 3.19 (6H, кв, *J* 7.3, *CH*₂(Et₃N)), 1.27 (9H, т, *J* 7.3, *CH*₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (D₂O): 0.68 (c); ¹⁹F-ЯМР (D₂O): 87.44 (c); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₆H₁₀F₃NO₆P⁻ вычислено 280.02; найдено 280.10; [2M-H]⁻ C₁₂H₂₀F₆N₂O₁₂P₂⁻ вычислено 561.05; найдено, 561.19.

Общая методика монофосфорилирования *N*-Fmoc-аминоспиртов в ацетонитриле с POCl₃

2-(2-*N*-Fmoc-аминоэтокси)этанол **3.15** или 3-(*N*-Fmoc)-аминопропанол **3.19** (0.6 ммоль) сушили соупариванием с MeCN (3×3 мл). Остаток после упаривания растворяли в MeCN (6 мл), полученный раствор охлаждали на ледяной бане. К раствору *N*-защищенного аминоспирта добавляли POCl₃ (1.2 ммоль, 0.108 мл) и Et₃N (0.6 ммоль, 0.084 мл). Охлаждение убирали. Через 12 ч реакционную смесь разлагали холодной водой (6 мл). Спустя 3 ч после разложения реакционную смесь упаривали. Продукты реакции разделяли методом ОФХ в линейном градиенте концентрации EtOH (0 \rightarrow 75 %) в воде. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали и высушивали под вакуумом. Целевые монофосфаты **3.16** и **3.20** получены в виде частичной Еt₃NH⁺ соли с выходом 88 % (0.53 ммоль) и 75 % (0.45 ммоль), соответственно.

2-[2-N-(9Н-Флуорен-9-

илметоксикарбонил)аминоэтокси]этилфосфат (соединение 3.16, Схема 3.4). R_f 0.55 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (DMSO-d6): 7.88 (2H, дт, *J* 7.3, 0.8, *H*-Ar), 7.69 (2H, уш.д, *J* 7.4, *H*-Ar), 7.41 (2H, дт, *J* 7.4, 0.8, *H*-Ar), 7.37 (1H, уш.т, *J* 4.5, *NH*), 7.33 (2H, дт, *J* 7.4, 0.9, *H*-Ar), 4.29 (2H, д, *J* 6.8, *CH*₂OC(O)), 4.21 (1H, т, *J* 6.8, *>CH*CH₂), 3.55 (2H, т, *J* 5.0, *CH*₂OP), 3.42 (2H, т, *J* 5.9, O*CH*₂CH₂O), 3.18–3.02 (4H, м, NH*CH*₂CH₂O, NHCH₂*CH*₂O); ³¹P-ЯМР (DMSO-d6): -0.22 (с); масс-спектр MALDI TOF (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₂₃NO₇P вычислено 408.121; найдено 408.091; [M+Na]⁺ C₁₉H₂₂NNaO₇P вычислено 430.103; найдено 430.073; [M+K]⁺ C₁₉H₂₂KNO₇P⁺ вычислено 446.077; найдено 446.053.

3-*N***-**(*9H***-Ф**луорен-9-илметоксикарбонил)аминопропилфосфат (соединение 3.20, Схема 3.6). R_f: 0.40 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (пиридин-d5): 8.22 (1H, т, *J* 5.8, *NH*), 7.68 (2H, д, *J* 7.5, *H*-Ar), 7.58 (2H, д, *J* 7.5, *H*-Ar), 7.24 (2H, т, *J* 7.4, *H*-Ar), 7.14 (2H, т, *J* 7.4, *H*-Ar), 4.42 (2H, д, *J* 7.2, *CH*₂OC(O)), 4.33 (2H, каж.кв, *J* 6.4, *CH*₂OP), 4.18 (1H, т, *J* 7.2, *>CH*CH₂), 3.51 (2H, каж.кв, *J* 6.2, NH*CH*₂CH₂), 1.95 (2H, каж.квин, *J* 6.4, CH₂*CH*₂CH₂); ³¹P (пиридин-d5): 2.28 (с); масс спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₈H₁₉NO₆P вычислено 376.095; найдено 376.000; [2M-H]⁻ C₃₆H₃₉N₂O₁₂P₂⁻ вычислено 753.198; найдено 753.090; [3M-H]⁻ C₅₄H₅₉N₃O₁₈P₃⁻ вычислено 1130.301; найдено 1130.084.

Образование пирофосфатной связи между АМФ и *О*-монофосфатом *N*-Fmoc-аминолинкера (Схема 3.7)

Синтез конъюгатов АДФ **3.23** и **3.24** проводили аналогично синтезу соединения **3.1** (способ 2, Раздел 4.2.1) путем активации *О*-монофосфатов *N*-Fmoc-аминолинкеров **3.16** и **3.20**, соответственно, и использовании интермедиатов **3.21** и **3.22** *in situ* в реакции с АМФ. Целевые пирофосфаты **3.23** и **3.24** очищали при помощи ОФХ в линейном градиенте концентрации EtOH $(0 \rightarrow 20 \%)$ в воде. Фракции, содержащие продукт, упаривали и высушивали под вакуумом. Выход конъюгатов **3.23** и **3.24** составил 80 % (0.48 ммоль) и 61 % (0.36 ммоль), соответственно.

Аденозин-5'-*O*-{ β -2-[2-*N*-(*9H*-флуорен-9илметоксикарбонил)аминоэтокси]этилпирофосфат} (соединение 3.23, Схема 3.7). *R_f*: 0.67 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 6:1:3); ¹H-ЯМР (DMSOd6): 8.39 (1H, c, *H*8-Ade), 8.15 (1H, c, *H*2-Ade), 7.86 (2H, дт, *J* 7.3, 1.0, *H*-Ar), 7.69 (2H, д, *J* 7.2, *H*-Ar), 7.44 (1H, т, *J* 5.6, *NH*CH₂), 7.40 (2H, дт, *J* 7.5, 1.0, *H*-Ar), 7.32 (2H, дт, *J* 7.3, 1.1, *H*-Ar), 5.91 (1H, д, *J* 5.3, H1), 4.54 (1H, уш.т, *J* 5.0, *OH*), 4.26 (2H, д, *J* 5.9, *CH*₂OC(O)), 4.20 (1H, т, *J* 5.9, >*CH*CH₂), 4.08-3.99 (3H, м, OH, H5') 3.96–3.86 (2H, м, H4', H2'), 3.53 (2H, т, *J* 5.1, *CH*₂OP), 3.40 (2H, т, *J* 6.1, *OCH*₂CH₂O), 3.17–3.10 (4H, м, NH*CH*₂CH₂O, NHCH₂*CH*₂O); ³¹P-ЯМР (DMSO-d6): -10.34 (д, *J* 19.8), -10.53 (д, *J* 19.8); масс спектр MALDI TOF (m/z): [M-H]⁻ C₂₉H₃₃N₆O₁₃P₂⁻ вычислено 735.158; найдено 735.061; [M+H]⁺ C₂₉H₃₅N₆O₁₃P₂⁺ вычислено 737.174; найдено 737.270.

Аденозин-5'-О-{β-[3-N-(9Н-флуорен-9-

илметоксикарбонил)аминопроп-1-ил]пирофосфат} (соединение 3.24, Схема 3.7). R_f 0.47 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 6:1:3); ¹H-ЯМР (D₂O): 8.19 (1H, c, H8-Ade),7.81 (1H, c, H2-Ade), 7.63 (2H, д, *J* 7.5, *H*-Ar), 7.40 (2H, д, *J* 7.3, *H*-Ar), 7.32–7.16 (4H, м, *H*-Ar), 5.83 (1H, д, *J* 5.5, H1), 4.53–4.48 (1H, м, H4), 4.40–4.34 (1H, м, H2), 4.30–4.23 (1H, м, H3), 4.20–4.10 (3H, м, *CH*₂OC(O), >*CHC*H₂), 3.90–3.81 (2H, м, *CH*₂OP), 3.07–2.98 (2H, м, NH*CH*₂CH₂), 1.66–1.53 (2H, м, CH₂*CH*₂CH₂); ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.40 (д, *J* 20.3), -10.98 (д, *J* 20.3); массспектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₉H₃₃N₆O₁₃P₂⁻ вычислено 705.148; найдено 705.091.

Общая методика деблокирования Етос-группы (Схема 3.7)

Конъюгат **3.23** или **3.24** растворяли в конц. водн. растворе аммиака (1 мл на 0.1 г конъюгата). Реакционную смесь выдерживали в течение 12 ч, затем упаривали. Остаток после упаривания суспендировали в MeOH (V) и осаждали 10-кратным избытком Et₂O (10V). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, затем промывали Et₂O и сушили на воздухе. Выходы конъюгатов **3.25** и **3.26** составили 93 % (0.45 ммоль) и 92 % (0.33 ммоль), соответственно.

Аденозин-5'-*O*-[β -2-(2-аминоэтокси)этилпирофосфат] (соединение 3.25, Схема 3.7). R_f 0.41 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 6:1:3); ¹H-ЯМР (D₂O): 8.50 (1H, c, H8-Ade), 8.25 (1H, c, H2-Ade), 6.14 (1H, д, *J* 6.0, H1), 4.56– 4.51 (1H, м, H2), 4.42–4.36 (1H, м, H3), 4.24–4.18 (2H, м, H5'), 4.09–4.02 (2H, м, *CH*₂OP), 3.74 (2H, т, *J* 5.0, NH₂CH₂*CH*₂O), 3.70–3.65 (2H, м, O*CH*₂CH₂O), 3.21– 3.15 (2H, м, NH₂*CH*₂CH₂O); ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.49 (д, *J* 19.9), -11.08 (д, *J* 19.9); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₄H₂₃N₆O₁₁P₂⁻ вычислено 513.090; найдено 512.994.

Аденозин-5'-*O*-[β-(3- аминопроп-1-ил)пирофосфат] (соединение 3.26, Схема 3.7). R_f 0.27 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 6:1:3); ¹H-ЯМР (D₂O): 8.50 (1H, c, H8-Ade), 8.24 (1H, c, H2-Ade), 6.12 (1H, д, *J* 5.7, H1'), 4.56– 4.51 (1H, м, *H*2'), 4.43–4.38 (1H, м, H3'), 4.27–4.21 (2H, м, H5'), 4.08 (2H, каж.кв, *J* 5.8, *CH*₂OP), 3.17 (2H, т, *J* 6.6, NH₂*CH*₂CH₂), 2.01 (2H, каж.квин, *J* 6.1, CH₂*CH*₂CH₂); ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.87 (д, *J* 19.6), -11.25 (д, *J* 19.6); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₃H₂₁N₆O₁₀P₂⁻ вычислено 483.079; найдено 483.094.

4.2.3. Синтез конъюгатов АДФ серии I

Общая методика синтеза конъюгатов 3.27-3.78 (Схема 3.8)

Соответствующую ароматическую кислоту (0.25 ммоль) растворяли в DMSO (1 мл). К полученному раствору добавляли HOSu (0.3 ммоль) и DCC (0.3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 16 ч. Осадок, образовавшийся в результате реакции, отделяли центрифугированием, осадок промывали DMSO (2×0.25 мл). Раствор сукцинимидного эфира соответствующей кислоты в DMSO (1.5 мл) добавляли к раствору производного АДФ с аминолинкером **3.25** или **3.26** (0.025 ммоль) в 1 М NaHCO₃/Na₂CO₃ (1.5 мл) рН 9.0. Реакционную смесь выдерживали в течение 12 ч. К реакционной смеси добавляли 2 % раствор LiClO₄ в ацетоне. Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном

и сушили на воздухе. Целевые конъюгаты **3.27-3.48** очищали при помощи ОФХ в линейном градиенте концентрации этанола (0 \rightarrow 20 %) в 0.1 М NH₄HCO₃/H₂O. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали и соупаривали несколько раз с 50 % EtOH/H₂O для удаления следов буфера.

Аденозин-5'-O-{β-[2-(*N*-(*изо*никотиноил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.27). Массспектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₀H₂₆N₇O₁₂P₂ вычислено 618.119; найдено 618.147.

```
Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-
```

никотиноил)аминоэтокси)этил]пирофосфат (соединение 3.28). Массспектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₀H₂₆N₇O₁₂P₂ вычислено 618.119; найдено 618.214.

```
Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(6-
```

гидроксиникотиноил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.29). Macc-спектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₀H₂₆N₇O₁₃P₂ вычислено 634.107; найдено 634.050.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(3-

аминобензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.30). Массспектр MALDI TOF (m/z): [M-2H+Na]⁻ C₂₁H₂₇N₇NaO₁₂P₂ вычислено 654.109; найдено 654.291.

```
Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(2-
```

метоксибензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.31). Массспектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₂H₂₉N₆O₁₃P₂ вычислено 647.127; найдено 647.925.

```
Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-бензоиламиноэтокси)этил]пирофосфат}
(соединение 3.32). Масс-спектр MALDI TOF (m/z): [M–H]<sup>-</sup> C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>2</sub>
вычислено 617.116; найдено 617.225.
```

```
Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(4-
```

метилбензоил)аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.33). Масс-

спектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₂H₂₉N₆O₁₂P₂ вычислено 631.132; найдено 631.380.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(4-

нитробензоил)аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.34). Массспектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₂₁H₂₆N₇O₁₄P₂ вычислено 662.101; найдено 661.992.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(3-

хлорбензоил)аминоэтокси)этил]пирофосфат (соединение 3.35). Массспектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₁H₂₆ClN₆O₁₂P₂ вычислено 651.077; найдено 651.341.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(2-

хлорбензоил)аминоэтокси)этил]пирофосфат (соединение 3.36). Массспектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₂₁H₂₆ClN₆O₁₂P₂ вычислено 651.077; найдено 651.092.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(2-

гидроксибензоил)аминоэтокси)этил]пирофосфат (соединение 3.37). Масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₂₁H₂₇N₆O₁₃P₂ вычислено 633.111; найдено 632.792; [M–2H+Na]⁻ C₂₁H₂₆N₆NaO₁₃P₂ вычислено 655.093; найдено 654.792; [M–3H+2Na]⁻ C₂₁H₂₅N₆Na₂O₁₃P₂ вычислено 677.075; найдено 676.891.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(4-

аминобензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.38). Массспектр ESI (m/z): [M+H]⁺ C₂₁H₃₀N₇O₁₂P₂ вычислено 634.143; найдено 634.200; [M+Na]⁺ C₂₁H₃₉N₇NaO₁₂P₂ вычислено 656.125; найдено 656.200.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(2,4-

диметилбензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.39). Масс-спектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₃H₃₁N₆O₁₂P₂ вычислено 645.148; найдено 645.505.

Аденозин-5'-O-{β-[2-(N-(2-метил-3-

нитробензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.40). Массспектр ESI (m/z): [M-2H+Na]⁻ C₂₂H₂₇N₇NaO₁₄P₂ вычислено 698.099; найдено 697.791. Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(4-аминометил-2-

нитробензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.41). Массспектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₂₂H₂₉N₈O₁₄P₂ вычислено 691.128; найдено 690.991; [M–2H+Na]⁻ C₂₂H₂₈N₈NaO₁₄P₂ вычислено 713.110; найдено 713.091.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(3,5-

динитробензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.42). Массспектр ESI (m/z): [M-2H]²⁻ C₂₁H₂₄N₈O₁₆P₂ вычислено 353.039; найдено 352.796.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-(4-

аминометилбензоил))аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.43). Macc-спектр MALDI TOF (m/z): [M–H]⁻ C₂₂H₃₀N₇O₁₂P₂ вычислено 646.143; найдено 646.099.

Аденозин-5'-О-{β-[3-N-(3-аминобензоил)аминопроп-1-

ил]пирофосфат} (соединение 3.44). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ С₂₀H₂₆N₇O₁₁P₂ вычислено 602.117; найдено 601.992; [M-2H+Na]⁻ С₂₀H₂₅N₇NaO₁₁P₂ вычислено 624.098; найдено 623.992.

Аденозин-5'-О-{β-[3-(*N*-никотиноил)аминопроп-1-ил]пирофосфат} (соединение 3.45). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₄N₇O₁₁P₂ вычислено 588.101; найдено 587.993; [M-2H+Na]⁻ C₁₉H₂₃N₇NaO₁₁P₂ вычислено 610.083; найдено 609.992.

Аденозин-5'-O-{^β-[3-(*N-изо*-никотиноил)аминопроп-1-

ил]пирофосфат} (соединение 3.46). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ С₁₉H₂₄N₇O₁₁P₂ вычислено 588.101; найдено 587.993; [M-2H+Na]⁻ С₁₉H₂₃N₇NaO₁₁P₂ вычислено 610.083; найдено 609.992.

Аденозин-5'-О-{β-[3-(2-метоксибензоил)аминопроп-1-

ил]пирофосфат} (соединение 3.47). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ С₂₁H₂₇N₆O₁₂P₂ вычислено 617.116; найдено 616.992; [M-2H+Na]⁻ С₂₁H₂₆N₇NaO₁₂P₂ вычислено 639.098; найдено 638.992.

Аденозин-5'-О-{β-[3-(6-гидроксиникотиноил)аминопроп-1ил]пирофосфат} (соединение 3.48). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₄N₇O₁₂P₂ вычислено 604.096; найдено 603.992; [M−2H+Na]⁻ C₁₉H₂₄N₇NaO₁₂P₂ вычислено 626.078; найдено 625.992.

4.2.4. Синтез 2'-гидроксиметилморфолиновых аналогов нуклеозидов

Общая методика синтеза 2'-гидроксиметилморфолиновых нуклеозидов 3.74-3.78 (Схема 3.9)

Рибонуклеозиды 3.54-3.58 (4 ммоль) суспендировали в EtOH (80 мл). Отдельно готовили раствор NaIO₄ (4.2 ммоль, 0.9 г) в воде (4 мл). Полученный водный раствор периодата натрия добавляли к спиртовому раствору нуклеозида при интенсивном перемешивании. Через 15 мин к реакционной смеси добавляли навеску (NH₄)₂B₄O₇·4H₂O (4.8 ммоль, 1.26 г) и Et₃N до значения рН 8.5-9. Реакцию проводили в течение 1.5 ч, поддерживая значения рН реакционной смеси в диапазоне 8.5-9 добавлением Et₃N. Спустя 1.5 ч реакционную смесь фильтровали, осадок промывали EtOH (2×4 мл). К фильтрату добавляли навеску NaCNBH₃ (5.2 ммоль, 0.326 г). Через 1 ч к реакционной смеси добавляли TFAA до значения pH 3-4. Спустя 2 ч упаривали. Остаток после реакционную смесь упаривания сушили соупариванием с MeCN (3×10 мл) и толуолом (3×10 мл), затем суспендировали в DMF (16 мл) с добавлением Et₃N (12 ммоль, 1.7 мл). К реакционной смеси добавляли TrCl (3.5 ммоль, 0.975 г). По окончании реакции к реакционной смеси добавляли MeOH (5 мл), раствор упаривали с CH₃CN до половины объема. Остаток после упаривания осаждали водой (300 мл). Образовавшийся осадок отделяли фильтрованием, сушили на воздухе, затем под вакуумом. Сухой остаток растворяли в CH₂Cl₂ (10 мл) и осаждали петролейным эфиром мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °С), осадок отделяли (250 центрифугированием, затем промывали петролейным эфиром и сушили на воздухе, затем под вакуумом.

2'-Гидроксиметил-4'-*N*-тритил-6'-(урацил-1-ил)морфолин

(соединение 3.74, Схема 3.9). Выход составил 67 %. R_f 0.42 (CH₂Cl₂-EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (ацетон-d6): 9.98 (1H, c, NH-Ura), 7.74-7.58 (6H, м, Tr), 7.44

(1H, д, *J* 8.2, H6-Ura), 7.32 (6H, каж.т, *J* 7.6, Tr), 7.19 (3H, каж.т, *J* 7.2, Tr), 6.13 (1H, дд, *J* 9.8, 2.3, H6'), 5.48 (1H, д, *J* 8.2, H5), 4.34-4.24 (1H, м, H2'), 3.87 (1H, т, *J* 6.1, OH), 3.62-3.48 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.34 (1H, д.т, *J* 11.3, 2.5, H5'), 3.22 (1H, д.т, *J* 11.8, 2.5, H3'), 1.56-1.47 (2H, м. H3', H5').

2'-Гидроксиметил-4'-*N*-тритил-6'-(тимин-1-ил)морфолин

(соединение 3.75, Схема 3.9). Выход составил 68 %. R_f 0.40 (CH₂Cl₂–ацетон, 3:1); R_f 0.33 (CH₂Cl₂–EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (ацетон-d6): 7.56-7.46 (6H, м, Tr), 7.35-7.27 (7H, м, H6-Thy, Tr), 7.19 (3H, каж.т, *J* 7.2, Tr), 6.12 (1H, дд, *J* 9.6, 2.4, H6'), 4.32-4.24 (1H, м, H2'), 3.60-3.47 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.29 (1H, дт, *J* 11.2, 2.5, H5'), 3.21 (1H, дт, *J* 11.8, 2.5, H3'), 1.71 (3H, c, CH₃-Thy), 1.55-1.48 (2H, м. H3', H5').

2'-Гидроксиметил-4'-*N***-тритил-6'-**(*N*⁶**-бензоиладенин-9-ил)морфолин** (соединение 3.76, Схема 3.9). Выход составил 70 %. R_f 0.18 (CH₂Cl₂–ацетон, 3:1); R_f 0.42 (CH₂Cl₂–EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (ацетон-d6): 9.97 (1H, c, NH₂-Ade), 8.65 (1H, c, H8-Ade), 8.26 (1H, c, H2-Ade), 8.09 (2H, каж.д, *J* 7.4, Bz), 7.67-7.50 (9H, м, Bz, Tr), 7.33 (6H, т, *J* 7.8, Tr), 7.20 (3H, каж.т, *J* 7.2, Tr), 6.48 (1H, дд, *J* 10.1, 2.4, H6'), 4.46-4.39 (1H, м, H2'), 3.94 (1H, т, *J* 6.2, OH), 3.63-3.50 (3H, м, H5', 2'-*CH*₂OH), 3.32 (1H, дт, *J* 11.9, 2.4, H3'), 2.09-2.07 (1H, м. H3'), 1.69-1.62 (1H, м, H5').

2'-Гидроксиметил-4'-*N*-тритил-6'-(*N*⁴-бензоилцитозин-1-

ил)морфолин (соединение 3.77, Схема 3.9). R_{*f*} 0.45 (CH₂Cl₂–ацетон, 3:1); R_{*f*} 0.31 (CH₂Cl₂–EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (ацетон-d6): 8.11 (2H, каж.д, *J* 7.1, Bz), 7.93 (1H, д, *J* 7.5, H6-Cyt), 7.63 (3H, тт, *J* 7.4, 2.0, Bz), 7.53 (6H, каж.т, *J* 7.5, Tr), 7.32 (7H, каж. т, *J* 7.6, H5-Cyt, Tr), 7.19 (3H, каж.т, *J* 7.2, Tr), 6.21 (1H, дд, *J* 9.2, 2.3, H6'), 4.37-4.30 (1H, м, H2'), 3.89 (1H, уш.с, OH), 3.65-3.54 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.51 (1H, дт, *J* 11.2, 2.4, H5'), 3.25 (1H, дт, *J* 11.9, 2.4, H3'), 1.57 (1H, дд, *J* 11.8, 10.6, H3'), 1.38 (1H, дд, *J* 11.2, 9.3, H5').

2'-Гидроксиметил-4'-N-тритил-6'-(N²-изобутирилгуанин-9-

ил)морфолин (соединение 3.78, Схема 3.9). Выход составил 61 %. R_f 0.17 (CH₂Cl₂-ацетон, 3:1); R_f 0.56 (CH₂Cl₂-EtOH, 9:1); ¹Н-ЯМР (ацетон-d6): 7.73

(1H, с, H8-Gua), 7.57-7.47 (6H, м, Tr), 7.33 (6H, каж.т, *J* 7.8, Tr), 7.19 (3H, каж.т, *J* 7.2, Tr), 6.09 (1H, дд, *J* 9,9, 2.4, H6'), 4.31-4.23 (1H, м, H2'), 3.58-3.45 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.39 (1H, дт, *J* 11.3, 3.4, H5'), 3.27 (1H, дт, *J* 11.9, 2.3, H3'), 3.04-2.94 (1H, м, CH-*i*Bu), 1.94 (1H, дд, *J* 11.8, 10.0, H3'), 1.58 (1H, дд, *J* 11.3, 10.5, H5'), 1.27 (6H, дд, *J* 10.4, 6.8, 2CH₃-*i*Bu).

4.2.5. Синтез конъюгатов АДФ серии Па

Общая методика синтеза конъюгатов АДФ 3.94, 3.95 (Схема 3.11)

Конъюгаты АДФ с аминолинкером **3.25**, **3.26** (0.08 ммоль) растворяли в DMSO (0.8 мл) с добавлением Et₃N (0.8 ммоль, 0.11 мл). К полученному раствору добавляли DMOX (0.8 ммоль, 0.1 г). Реакцию проводили в течение 48 ч. Затем реакционную смесь выливали в холодную смесь диэтилового эфира и ацетона (2:1, 30 мл). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и сушили на воздухе.

Аденозин-5'-О-{β-[2-(N-

(метоксиоксалил)аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.94). Выход составил 90 % (0.072 ммоль, 0.043 г). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.57 (1H, c, H8-Ade), 8.32 (1H, c, H2-Ade), 6.14 (1H, д, *J* 5.7, H1'), 4.52-4.51 (1H, м, H2'), 4.41-4.36 (1H, м, H3'), 4.25-4.19 (2H, м, H5'), 4.08-4.00 (2H, м, *CH*₂OP), 3.86 (3H, c. *CH*₃O), 3.71-3.65 (2H, м, *OCH*₂CH₂O), 3.63 (2H, т, *J* 5.4, NHCH₂*CH*₂O), 3.43 (2H, т, *J* 5.4, NH*CH*₂CH₂O); ³¹P-ЯМР (D₂O): -11.07 (д, *J* 21.2), -11.50 (д, *J* 21.2); массспектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₁₇H₂₅N₆O₁₁P₂ вычислено 599.09; найдено 598.992.

Аденозин-5'-*O*-{β-[2-(*N*-(метоксиоксалил)аминопроп-1ил]пирофосфат} (соединение 3.95). Выход составил 85 % (0.068 ммоль, 0.039 г). ¹Н-ЯМР (DMSO-d6): 8.45 (1H, c, H8-Ade), 8.14 (1H, c, H2-Ade), 5.90 (1H, д, *J* 4.9, H1'), 4.52-4.45 (1H, м, H4'), 4.32 (1H, каж.т., *J* 4.3, H2'), 4.08-3.94 (3H, м, H3', H5'), 3.84-3.75 (2H, м, *CH*₂OP), 3.73 (3H, c. *CH*₃O), 3.29-3.18 (2H, м, NH*CH*₂CH₂O), 1.64 (2H, каж.квин, *J* 6.1, CH₂*CH*₂CH₂); ³¹P-ЯМР (DMSO-d6): -10.91 (д, *J* 23.5), -11.38 (д, *J* 23.5); масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₁₆H₂₃N₆O₁₁P₂ вычислено 569.08; найдено 568.993.

Общая методика синтеза конъюгатов АДФ 3.96-3.105 (Схема 3.11)

К раствору конъюгатов **3.94, 3.95** (0.01 ммоль) в DMSO (0.2 мл) добавляли 2'-аминометилморфолиновые нуклеозиды **3.49-3.53** (0.05 ммоль) и Et₃N (0.1 ммоль, 0.014 мл). Реакционную смесь перемешивали 2 суток. По окончании реакции в реакционную смесь добавляли смесь диэтилового эфира и ацетона (2:1, 2.0 мл). Реакционную смесь охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, остаток растворяли в воде. Конъюгаты **3.96-3.105** выделяли методом ОФХ в линейном градиенте концентрации EtOH (0 \rightarrow 10 %) в 0.1 М NH₄HCO₃. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, растворяли в H₂O (0.2 мл) и осаждали 4 % раствором NaClO₄ в ацетоне в виде натриевых солей как описано выше. При необходимости целевые соединения дополнительно очищали с помощью анионообменной хроматографии в градиенте концентрации NH₄HCO₃ (0 \rightarrow 0.75 M) в 20 % водном EtOH. Гомогенность продуктов подтверждали с помощью TCX и офВЭЖХ. Содержание целевого продукта было не ниже 98 %.

[6-(Урацил-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометилоксалил-*N*-[2-(2аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.96)

Синтез соединения **3.96** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.49** и производного АДФ **3.94**. Выход составил 0.007 ммоль (70 %). R_f 0.34 (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр MALDI TOF (m/z): $[M+H]^+$ C₂₅H₃₆N₁₀O₁₆P₂ вычислено 794.18, найдено 795.03.

[6-(Тимин-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-[2-(2аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.97)

Синтез соединения **3.97** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.50** и производного АДФ **3.94**. Выход составил 0.007 ммоль (70 %). $R_f 0.39$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{26}H_{38}N_{10}O_{16}P_2$ вычислено 808.19, найдено 807.19.

[6-(Аденин-9-ил)морфолин]-2-*N*-аминометилоксалил-*N*-[2-(2аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.98) Синтез соединения **3.98** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.51** и производного АДФ **3.94**. Выход составил 0.007 ммоль (70 %). $R_f 0.28$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{26}H_{37}N_{13}O_{14}P_2$ вычислено 817.21, найдено 816.09.

[6-(Цитозин-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-[2-(2аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.99)

Синтез соединения **3.99** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.52** и производного АДФ **3.94**. Выход составил 0.006 ммоль (60 %). R_f 0.25 (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр MALDI TOF (m/z): $[M+H]^+$ C₂₅H₃₇N₁₁O₁₅P₂: вычислено 793.19, найдено 794.08

[6-(Гуанин-9-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-[2-(2аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.100)

Синтез соединения **3.100** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.53** и производного АДФ **3.94**. Выход составил 0.006 ммоль (60 %). R_f 0.24 (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{26}H_{37}N_{13}O_{15}P_2$ вычислено 833.20, найдено 832.09.

[6-(Урацил-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометилоксалил-*N*-(3аминопропил)-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.101)

Синтез соединения **3.101** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.49** и производного АДФ **3.95**. Выход составил 0.007 ммоль (70 %). $R_f 0.28$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{24}H_{34}N_{10}O_{15}P_2$ вычислено 764.17, найдено 763.09.

[6-(Тимин-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил)-*N*-(3-аминопропил)-βдифосфосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.102)

Синтез соединения **3.102** осуществляли по вышеприведенной методике исходя из мономера **3.50** и производного АДФ **3.95**. Выход составил 0.008 ммоль (80 %). $R_f 0.37$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{36}N_{10}O_{15}P_2$ вычислено 778.18, найдено 777.09.

[6-(Аденин-9-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-(3-аминопропил)-βдифосфосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.103) Синтез соединения **3.103** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.51** и производного АДФ **3.95**. Выход составил 0.007 ммоль (70 %). $R_f 0.27$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{35}N_{13}O_{13}P_2$ вычислено 787,20, найдено 786.09.

[6-(Цитозин-1-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-(3-аминопропил)β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.104)

Синтез соединения **3.104** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.52** и производного АДФ **3.95**. Выход составил 0.006 ммоль (60 %). $R_f 0.24$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{24}H_{35}N_{11}O_{13}P_2$ вычислено 763.18, найдено 762.09.

[6-(Гуанин-9-ил)морфолин]-2-*N*-аминометил-*N*-(3-аминопропил)-βдифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.105)

Синтез соединения **3.105** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из мономера **3.53** и производного АДФ **3.95**. Выход составил 0.006 ммоль (60 %). $R_f 0.22$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{35}N_{13}O_{14}P_2$ вычислено 803.19, найдено 802.09.

Общая методика синтеза конъюгатов 3.106, 3.108 (Схема 3.11)

К раствору конъюгатов **3.94, 3.95** (0.01 ммоль) в воде (0.1 мл) добавляли раствор 0.05 М NaOH/вода (0.02 ммоль, 0.4 мл). По завершении реакции реакционную смесь упаривали.

Аденозин-5'-*О*-{β-[2-(*N*-

(гидроксиоксалил)аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.106). Масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₁₆H₂₃N₆O₁₄P₂ вычислено 585.07, найдено 584.893; [M-2H]²⁻ C₈H₁₁N₃O₇P вычислено 292.04; найдено 291.997.

Аденозин-5'-О-{β-[3-N-(гидроксиоксалил)аминопроп-1-

ил]пирофосфат} (соединение 3.108). Масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ С₁₅H₂₁N₆O₁₃P₂ вычислено 555.06, найдено 554.993; [M-2H+Na]⁻ С₁₅H₂₀N₆NaO₁₃P₂ вычислено 577.06; найдено 576.993; [M-3H+2Na]⁻ С₁₅H₁₉N₆Na₂O₁₃P₂ вычислено 599.03, найдено 598.992.

Общая методика синтеза конъюгатов 3.107, 3.109 (Схема 3.11)

К раствору конъюгатов **3.94, 3.95** (1-2 мг) в МеОН (0.1-0.2 мл) добавляли конц. водн. раствор аммиака (0.01-0.02 мл). По завершении реакции реакционную смесь упаривали. Остаток растворяли в воде (0.1-0.2 мл) и осаждали раствором 4 % NaClO₄ в ацетоне (1-2 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и сушили на воздухе.

Аденозин-5'-*О*-{β-[2-(*N*-

(аминооксалил)аминоэтокси)этил]пирофосфат} (соединение 3.107). Массспектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₁₆H₂₄N₇O₁₃P₂ вычислено 584.09, найдено 584.093.

Аденозин-5'-О-{β-[3-N-(аминооксалил)аминопроп-1-

ил]пирофосфат} (соединение 3.109). Масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ С₁₅H₂₂N₇O₁₂P₂ вычислено 554.08, найдено 554.093; [M–2H+Na]⁻ С₁₅H₂₁N₇NaO₁₂P₂ вычислено 576.06, найдено 576.093.

4.2.6. Синтез конъюгатов АДФ серии Пб

Общая методика синтеза конъюгатов АДФ 3.115-3.124

Вос-защищенные морфолиновые нуклеозиды **3.110-3.114** (0.1 ммоль) растворяли в DMSO (0.3 мл). К образовавшемуся раствору добавляли HOSu (0.15 ммоль, 0.017 г) и DCC (0.12 ммоль, 0.025 мг). Раствор перемешивали в течение 16 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, осадок промывали DMSO (0.1 мл). Объединенные супернатанты добавляли к раствору конъюгатов **3.25** или **3.26** (0.01 ммоль) в 1 М NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.0 (0.4 мл). Реакционную смесь перемешивали 3 ч, затем осадок отделяли центрифугированием. Супернатант концентрировали до начала выпадения осадка. Защищенные по аминогруппе и гетероциклическому основанию конъюгаты выделяли методом ОФХ из супернатанта в линейном градиенте концентрации EtOH (0 \rightarrow 50 %) в 0.1 М NH₄HCO₃. Общий объем элюента 200 мл. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток упаривали несколько раз с водным этанолом для удаления буфера. Для деблокирования

гетероциклического основания в случае синтеза конъюгатов **3.117-3.119** и **3.122-3.124** к остатку после упаривания добавляли конц. водный аммиак (2 мл). Спустя 24–36 ч реакционную смесь упаривали. Для удаления Вос защиты, Вос-защищенные конъюгаты растворяли в НСООН (0.5 мл). Через 2 ч реакционную смесь упаривали, деблокированный продукт растворяли в воде (0.2 мл) и осаждали добавлением 4 % NaClO₄ в ацетоне (2 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в воде (0.1 мл), осаждение повторяли. Осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе. При необходимости, полностью деблокированные конъюгаты дополнительно очищали с помощью ОФХ в линейном градиенте концентрации EtOH (0 \rightarrow 10 %) в воде. Гомогенность продуктов подтверждали с помощью TCX и офВЭЖХ. Содержание целевого продукта было не ниже 98 %.

[2-(Аминометил)-6-(урацил-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-[2-(2-аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-О-аденозин (3.115)

Синтез соединения **3.115** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.110** и производного АДФ **3.25**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.33$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{38}N_{10}O_{15}P_2$ вычислено 780.20, найдено 779.19.

[2-(Аминометил)-6-(тимин-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-[2-(2-аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.116)

Синтез соединения **3.116** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.111** и производного АДФ **3.25**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.41$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{26}H_{40}N_{10}O_{15}P_2$ вычислено 794.21, найдено 793.29.

[2-(Аминометил)-6-(аденин-9-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-[2-(2-аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.117) Синтез соединения **3.117** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.112** и производного АДФ **3.25**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.31$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{26}H_{39}N_{13}O_{13}P_2$ вычислено 803.23, найдено 802.19.

[2-(Аминометил)-6-(цитозин-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-[2-(2-аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.118)

Синтез соединения **3.118** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.113** и производного АДФ **3.25**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.29$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{39}N_{11}O_{14}P_2$: вычислено 779.22, найдено 778.29.

[2-(Аминометил)-6-(гуанин-9-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-[2-(2-аминоэтокси)этил]-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.119)

Синтез соединения **3.119** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.114** и производного АДФ **3.25**.Выход составил 0.004 ммоль (40 %). R_f 0.26 ((*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр MALDI TOF (m/z): $[M-H]^-$ C₂₆H₃₉N₁₃O₁₄P₂ вычислено 819.22, найдено 818.02.

[2-(Аминометил)-6-(урацил-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-(3аминопропил)-β-дифосфо-5'-*О*-аденозин (соединение 3.120)

Синтез соединения **3.120** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.110** и производного АДФ **3.26**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.33$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{24}H_{36}N_{10}O_{14}P_2$ вычислено 750.19, найдено 749.29.

[2-(Аминометил)-6-(тимин-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-(3аминопропил)-β-дифосфо-5'-*О*-аденозин (соединение 3.121)

Синтез соединения **3.121** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.111** и производного АДФ **3.26**. Выход

составил 0.005 ммоль (50 %). R_f 0.39 (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): [M–H]⁻ C₂₅H₃₈N₁₀O₁₄P₂ вычислено 764.20, найдено 763.19.

[2-(Аминометил)-6-(аденин-9-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-(3аминопропил)-β-дифосфо-5'-*О*-аденозин (соединение 3.122)

Синтез соединения **3.122** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.112** и производного АДФ **3.26**. Выход составил 0.004 ммоль (40 %). $R_f 0.33$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{37}N_{13}O_{12}P_2$ вычислено 773.22, найдено 772.19.

[2-(Аминометил)-6-(цитозин-1-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-(3-аминопропил)-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.123)

Синтез соединения **3.123** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.113** и производного АДФ **3.26**. Выход составил 0.005 ммоль (50 %). $R_f 0.26$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр ESI (m/z): $[M-H]^- C_{24}H_{37}N_{11}O_{13}P_2$ вычислено 749.20, найдено 748.29.

[2-(Аминометил)-6-(гуанин-9-ил)морфолин]-4-метилкарбонил-*N*-(3аминопропил)-β-дифосфо-5'-*O*-аденозин (соединение 3.124)

Синтез соединения **3.124** осуществляли по вышеприведенной методике, исходя из морфолинового нуклеозида **3.114** и производного АДФ **3.26**. Выход составил 0.004 ммоль (40 %). $R_f 0.24$ (*i*PrOH–конц. водный аммиак–H₂O, 7:1:2); масс-спектр MALDI TOF (m/z): $[M-H]^- C_{25}H_{37}N_{13}O_{13}P_2$ вычислено 789.21, найдено 787.99.

4.2.7. Синтез 5-галогенпиримидиновых производных морфолиновых нуклеозидов

Общая методика синтеза 5-иодпиримидиновых нуклеозидов согласно протоколу [244] (Схема 3.13)

Нуклеозиды **3.54**, **3.144** (19 ммоль) суспендировали в воде (5.7 мл). К полученной суспензии добавляли HIO₃ (9.7 ммоль, 1.7 г), AcOH (15.2 мл) и раствор I₂ (11.22 ммоль, 2.85 г) в CCl₄ (3.8 мл). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 ч при 40 °C. Затем к реакционной смеси добавляли воду (20 мл), охлаждали (4 °C, 12 ч). Осадок отделяли фильтрованием, промывали водой (2×10 мл). Объединенные супернатанты разбавляли водой (до объема 250 мл). Полученный водный раствор промывали бензолом (3×150 мл). Водный раствор упаривали. Продукты реакции разделяли методом ОФХ в линейном градиенте концентрации этанола (0 \rightarrow 30 %) в воде. Фракции, содержащие целевой продукт **3.145** или **3.146**, упаривали.

5-Иодуридин (соединение 3.145). Выход составил 40 % (7.6 ммоль, 2.94 г). *R*_f 0.13 (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 11.70 (1H, c, NH), 8.48 (1H, c, H6-Ura), 5.71 (1H, д, *J* 4.3, H1'), 5.45 (1H, д, *J* 4.6, 2'-OH), 5.29 (1H, т, *J* 4.6, 5'-OH), 5.10 (1H, д, *J* 3.6, 3'-OH), 4.00 (2H, д.кв, *J* 27.3, 4.4, H3', H2'), 3.96 (1H, уш.с, H4'), 3.62 (2H, дд, *J* 57.1, 11.5, H5'); ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 160.61, 150.45, 145.21, 88.33, 84.75, 74.01, 69.42, 68.96, 60.21.

5-Иодцитидин (соединение 3.146). Выход составил 51 % (9.6 ммоль, 3.54 г). *R*_f 0.25 (CH₂Cl₂–MeOH, 4:1). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 8.42 (1H, c, H6-Cyt), 7.86 (1H, c, NH₂-Cyt), 5.69 (1H, д, *J* 3.1, H1'), 5.40 (1H, уш.с, 2'-OH), 5.25 (1H, уш.с, 5'-OH), 5.02 (1H, уш.с, 3'-OH), 3.96-3.90 (2H, м, H3', H2'), 3.86-3.81 (1H, м, H4'), 3.62 (2H, дд, *J* 74.9, 11.9, H5'); ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 163.88, 154.31, 147.88, 89.59, 84.19, 74.54, 69.01, 60.04, 56.86.

Общая методика синтеза ацетилированных производных уридина и цитидина (соединение 3.152 Схема 3.15, соединения 3.154, 3.155, Схема 3.16)

Уридин **3.54**, *N*⁴-Вz-цитидин **3.57** или цитидин **3.144** (10 ммоль) сушили соупариванием с пиридином (3×10 мл). Остаток растворяли в пиридине (50 мл) и охлаждали на ледяной бане. Затем к полученной суспензии добавляли уксусный ангидрид (50 ммоль, 4.6 мл в случае **3.54** и **3.57**; 60 ммоль, 5.7 мл в случае **3.144**). Охлаждение убирали. Реакцию проводили в течение 12 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разлагали добавлением воды (20 мл).

<u>В случае синтеза соединений 3.152 и 3.155</u> реакционную смесь упаривали. Остаток после упаривания растворяли в CH_2Cl_2 (300 мл). Полученный раствор промывали нас. водн. раствором NaHCO₃ (300 мл) и водой (3×200 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Остаток после упаривания растворяли в CH_2Cl_2 (20 мл) и осаждали добавлением петролейного эфира (250 мл). Образовавшуюся суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок фильтровали, промывали петролейным эфиром и сушили на воздухе.

<u>В случае синтеза соединения 3.155</u> реакционную смесь упаривали, соупаривали со смесью вода и толуол (3:1; 5×50 мл), затем с толуолом (2×20 мл) для удаления пиридина. Остаток после упаривания растворяли в CH₂Cl₂ (20 мл) и осаждали добавлением смеси петролейного и диэтилого эфиров (1:1, 250 мл). Образовавшуюся суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок фильтровали, промывали петролейным эфиром и сушили на воздухе.

2',3',5'-Три-О-ацетилуридин (соединение 3.153). Выход составил 98 % (9.8 ммоль, 3.63 г). *R*_f 0.23 (Петр. эфир–EtOAc, 1:2); ¹H-ЯМР (CD₃CN): 9.52 (1H, c, NH-Ura), 7.47 (1H, д, *J* 8.18, H6-Ura), 5.90 (1H, д, *J* 5.02, H1'), 5.68 (1H, д, *J* 8.09, H5-Ura), 5.37-5.27 (2H, м, H2', H3'), 4.32-4.18 (3H, м, H4', H5'), 2.04 (3H, c, CH₃), 2.03 (3H, c, CH₃), 2.01 (3H, c, CH₃); ¹³C-ЯМР (CD₃CN): 171.33,

170.77, 170.67, 164.14, 151.45, 141.55, 103.58, 88.75, 80.79, 73.53, 70.99, 63.99, 21.00, 20.75, 20.65.

*N*⁴-Бензоил-2',3',5'-три-*О*-ацетилцитидин (3.154). Выход составил 97 % (9.7 ммоль, 4.59 г). ¹Н-ЯМР (DMSO-d₆): 11.37 (1H, c, NH-Cyt), 8.19 (1H, д, *J* 7.6, H6-Cyt), 8.00 (2H, каж.д, *J* 7.7, Bz), 7.64 (1H, каж.т, *J* 7.5, Bz), 7.52 (2H, каж.т, *J* 7.6, Bz), 7.40 (1H, т, *J* 7.5, H5), 5.93 (1H, д, *J* 3.7, H1'), 5.57-5.51 (1H, м, H2'), 5.39 (1H, т, *J* 6.3, H3'), 4.41-4.21 (3H, м, H4', H5'), 2.08 (3H, c, CH₃), 2.07 (3H, c, CH₃), 2.06 (3H, c, CH₃); ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 170.18, 169.46, 167.48, 154.30, 146.95, 133.02, 128.54, 96.84, 90.85, 79.21, 72.74, 69.69, 62.89, 20.63, 20.37.

*N*⁴,2',3',5'-Тетраацетилцитидин (3.155). Выход составил 99 % (9.9 ммоль, 4.07 г). ¹Н-ЯМР (DMSO-d₆): 11.03 (1H, c, NH-Cyt), 8.13 (1H, д, *J* 7.6, H6-Cyt), 7.26 (1H, д, *J* 7.5, H5-Cyt), 5.91 (1H, д, *J* 3.6, H1'), 5.53-5.49 (1H, м, H2'), 5.39 (1H, т, *J* 6.2, H3'), 4.40-4.21 (3H, м, H4', H5'), 2.13 (3H, c, CH₃), 2.09 (3H, c, CH₃), 2.08 (3H, c, CH₃), 2.06 (3H, c, CH₃); ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 171.17, 170.12, 169.40, 163.04, 154.27, 146.98, 96.03, 90.84, 79.15, 72.71, 69.69, 62.90, 24.43, 20.57, 20.32.

Общая методика иодирования пиримидиновых нуклеозидов согласно протоколу [245] (Схема 3.15 и Схема 3.16).

САN сушили над P₂O₅ под вакуумом при 60 °C в течение 4 ч.

<u>Иодирование при помощи I₂ и CAN</u>. Защищенные нуклеозиды **3.152**, **3.154** или **3.155** (5 ммоль) суспендировали в MeCN (80 мл). К суспензии добавляли I₂ (3 ммоль, 0.76 г) и CAN (2.5 ммоль, 1.37 г). Реакцию проводили при 80°C при интенсивном перемешивании в течение 1 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали. К остатку после упаривания добавляли холодную смесь EtOAc (200 мл), нас. водн. раствор NaCl (100 мл) и 5 % NaHSO₃ (w/v, 50 мл). Водный раствор отделяли и промывали EtOAc (2×100 мл). Объединенные органические растворы промывали холодным раствором 5 % NaHSO₃ (w/v, 50 мл), затем нас. водн. Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Целевой продукт выделяли при помощи хроматографии на силикагеле в ступенчатом градиенте концентрации ацетона (0 \rightarrow 15 %) в CH₂Cl₂ (шаг 5 %). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали.

2',3',5'-Три-О-ацетил-5-иодуридин (соединение 3.153). Выход составил 93 % (4.65 ммоль, 2.31 г). R_f 0.7 (CH₂Cl₂–ацетон, 4:1); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.09 (1H, c, NH-Ura), 7.88 (1H, c H6-Ura), 6.08-6.05 (1H, м, H1'), 5.34-5.30 (2H, м, H2', H3'), 4.42-4.31 (3H, м, H4', H5'), 2.23 (3H, c, CH₃), 2.12 (3H, c, CH₃), 2.09 (3H, c, CH₃); ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.19, 169.73, 169.72, 159.57, 149.99, 143.87, 87.36, 80.49, 73.23, 70.35, 69.70, 63.15, 21.21, 20.61, 20.51.

<u>Иодирование при помощи NaI и CAN</u>. Нуклеозиды **3.144** или **3.155** (2 ммоль) суспендировали в AcOH (32 мл). К суспензии добавляли NaI (2.4 ммоль, 0.36 г) и CAN (4 ммоль, 2.19 г). Реакцию проводили при интенссивном перемешивании при 80°C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, упаривали и соупаривали со смесью EtOH и толуол (2:1; 3×40 мл), EtOH (3×40 мл). Целевой продукт **3.146** очищали при помощи хроматографии на силикагеле в ступенчатом градиенте концентрации MeOH ($0 \rightarrow 50$ %) в CH₂Cl₂ (шаг 10 %). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток растворяли в MeOH (5 мл) и осаждали добавлением EtOAc (50 мл). Выход 5-иодцитидина **3.146** из цитидина **3.144** составил 55 % (1.1 ммоль, 0.41 г).

Деацетилирование 2',3',5'-три-*О*-ацетил-5-иодуридина (соединение 3.153, Схема 3.15).

Соединение **3.153** (3.87 ммоль, 1.92 г) растворяли в МеОН (20 мл) и добавляли конц. водн. раствор NH₃ (20 мл). Спустя 1 ч реакционную смесь упаривали и соупаривали со смесью EtOH–EtOAc–толуол (1:1:2; 2×80 мл). Целевой продукт **3.145** очищали при помощи хроматографии на силикагеле в ступенчатом градиенте концентрации MeOH (0 \rightarrow 80 %) в CH₂Cl₂ (шаг 20 %). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали. Выход 5-иодуридина **3.145** составил 98 % (3.83 ммоль, 1.42 г).

Синтез 4'-N-тритилморфолиновых нуклеозидов 3.141 и 3.150.

Синтез соединений **3.141** и **3.150** осуществляли аналогично синтезу соединений **3.74-3.78** (Раздел 4.2.4). В качестве исходных соединений использовали 5-иоднуклеозиды **3.145** или **3.146**, полученные согласно протоколу [245] (Схема 3.15 и Схема 3.16). Выходы соединений **3.141** и **3.150** составили 55 % (2.2 ммоль, 1.31 г) и 65 % (2.6 ммоль, 1.54 г), соотвественно.

В случае использования 5-иоднуклеозидов **3.145** или **3.146**, полученных согласно протоколу [244] (Схема 3.13), в синтезе морфолиновых нуклеозидов (Схема 3.14 A), продукты реакции разделяли при помощи хроматографии на силикагеле в ступенчатом градиенте концентрации ацетона ($0 \rightarrow 25$ %) в CH₂Cl₂ (шаг 5 %). Выходы соединений **3.141** и **3.150** составили 25 % (1 ммоль, 0.59 г) и 18 % (0.7 ммоль, 0.43 г), соотвественно.

2'-Гидроксиметил-4'-*N***-тритил-6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолин** (соединение 3.141). *R*_f 0.57 (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 11.70 (1H, c, NH-Ura), 7.86 (1H, c, H6-Ura), 7.15-7.60 (15H, м, Tr), 5.94 (1H, дд, *J* 9.4, 2.0, H6'), 4.75 (1H, т, *J* 6.0, 2'-CH₂*OH*), 4.15 (1H, м, H2'), 3.40 (2H, т, *J* 5.3, 2'-*CH*₂OH), 3.20 (1H, каж.д, *J* 11.4, H5'), 2.98 (1H, каж.д, *J* 11.8, H3'), 1.42 (1H, каж.т, *J* 11.2, H3'), 1.32 (1H, каж.т, *J* 10.5, H5'); ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 160.45, 149.51, 144.31, 141.12, 129.28-126.20, 80.52, 76.98, 76.27, 69.57, 61.93, 51.70, 48.95; масс-спектр MALDI-TOF (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₅IN₃O₄ вычислено 594.089, найдено 594.035.

2'-Гидроксиметил-4'-*N***-тритил-6'-(5-иодцитозин-1-ил)морфолин** (соединение 3.150). *R*_f 0.51 (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.41 (1H, уш.с, NH₂-Cyt), 7.55 (1H, c, H6), 7.52-7.03 (15H, м, Tr), 6.11 (1H, д, *J* 8.17, H6'), 5.76 (1H, уш.с, 2'-CH₂*OH*), 4.36-4.22 (1H, м, H2'), 3.67-3.49 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.44 (1H, каж. д, *J* 10.08, H5'), 3.17-2.99 (1H, м, H3'), 1.48-1.16 (2H, м. H5', H3'); ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 163.57, 154.26, 146.71, 145.14, 129.33, 128.01, 126.58, 81.97, 78.06, 76.87, 63.68, 56.99, 52.91, 49.06; масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ С₂₈H₂₆IN₄O₃ вычислено 593.105, найдено 593.092.

Синтез 4'-*N*-тритилморфолинового нуклеозида 3.142 (Схема 3.17).

Синтез соединения **3.142** осуществляли из 5-бромуридина **3.156**, аналогично синтезу соединений **3.74-3.78** (Раздел 4.2.4). Выход соединения **3.142** составил 60 % (0.6 ммоль, 0.323 г).

2'-Гидроксиметил-4'-*N***-тритил-6'-(5-бромурацил-1-ил)морфолин** (соединение 3.142). R_f 0.48 (CH₂Cl₂—EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (DMSO-d6): 7.90 (1H, с, H6-Ura), 7.05-7.60 (15H, м, Tr), 5.97 (1H, дд, *J* 9.3, 2.2, H6'), 4.75 (1H, т, *J* 5.7, 2'-CH₂*OH*), 4.13-4.21 (1H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.20-3.25 (1H, м, H3'), 2.97-3.02 (1H, м, H5'),1.40-1.47 (1H, м, H3'), 1.30-1.38 (1H, м, H5'); ¹³C-ЯМР (DMSO-d6): 159.14, 149.19, 147.81, 139.93, 129.28-126.29, 95.80, 76.97, 76.29, 61.96, 51.68, 48.94; масс-спектр ESI (m/z): [M-H]- C₂₈H₂₅BrN₃O₄ вычислено 547.11, найдено 546.99.

Синтез 4'-*N*-тритилморфолинового нуклеозида 3.143 (Схема 3.17).

Синтез соединения **3.143** осуществляли из 5-хлоруридина **3.158** аналогично синтезу соединений **3.74-3.78** (Раздел 4.2.4). Выход соединения **3.143** составил 73 % (0.38 ммоль, 0.192 г).

2'-Гидроксиметил-4'-*N***-тритил-6'-(5-хлорурацил-1-ил)морфолин** (соединение 3.143). R_f 0.54 (CH₂Cl₂–EtOH, 9.5:0.5); ¹H-ЯМР (пиридин-d5): 8.06 (1H, c, H6-Ura), 7.13-7.76 (15H, м, Tr), 5.97 (1H, дд, *J* 9.5, 2.2, H6'), 4.56-4.64 (1H, м, H2'), 3.79-3.95 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.60-3.68 (1H, м, H3'), 3.45-3.52 (1H, м, H5'),1.74-1.87 (2H, м, H3', H5'); ¹³C-ЯМР (пиридин-d5): 160.47, 150.74, 138.17, 130.20-127.17, 109.31, 81.68, 79.13, 77.59, 63.57, 52.90, 50.46; массспектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₅ClN₃O₄ вычислено 502.16, найдено 502.49.

4.2.8. Синтез монофосфатов 4'-N-Tr-морфолиновых нуклеозидов

Общая методика монофосфорилирования морфолиновых нуклеозидов (Схема 3.18)

Морфолиновые нуклеозиды **3.74-3.78**, **3.141-3.143** (0.1 ммоль) растворяли в пиридине (1 мл). Раствор охлаждали на ледяной бане при перемешивании. К раствору нуклеозида добавляли POCl₃ (37 мкл, 0.4 ммоль).

Реакцию проводили при охлаждении в течение 20 минут. Реакционную смесь разлагали путем добавления к холодному раствору 1 М ТЭАБ (2 мл). К полученной смеси добавляли CH_2Cl_2 (10 мл) и воду (10 мл). Водный слой промывали CH_2Cl_2 (10 мл). Объединенные органические растворы сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Остаток после упаривания растворяли в CH_2Cl_2 (1 мл) и осаждали добавлением петролейного эфира (12 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали петролейным эфиром и сушили на воздухе. Целевые монофосфаты получены в виде Et_3NH^+ соли.

В случае синтеза монофосфатов **3.133**, **3.142**, **3.143**, реакционную смесь монофосфорилирования разлагали путем добавления к холодному раствору 1 М ТЭАБ (4 мл). Спустя 1 ч полученную суспензию упаривали до объема 1-2 мл. Остаток после упаривания наносили на колонку с RP C-18. Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации MeCN (0 \rightarrow 75 %) в воде. Общий объем элюента 300 мл. Фракции, содержащие целевые монофосфаты **3.133**, **3.142**, **3.143**, упаривали. Монофосфаты получены в виде Et₃NH⁺ соли.

2'-О-Фосфометил-4'-Л-тритил-6'-(урацил-1-ил)морфолин

(соединение 3.133). Выход составил 60 % (0.06 ммоль, 0.038 г). R_f 0.27 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (CD₃CN): 7.54-7.12 (16H, м, H6-Ura, Tr), 6.02 (1H, дд, J 9.8, 2.3, H6'), 5.57 (1H, д, J 8.1, H5), 4.41-4.30 (1H, м, H2'), 3.74-3.59 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.22 (1H, дт, J 11.4, 2.3, H5'), 3.06 (8H, кв, J 7.3, CH₂(Et₃N)), 1.42-1.29 (2H, м, H3', H5'), 1.17 (12H, т, J 7.3, CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -0.11 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₇N₃O₇P вычислено 548.159, найдено 548.093.

2'-О-Фосфометил-4'-N-тритил-6'-(тимин-1-ил)морфолин

(соединение 3.134). Выход составил 85 % (0.085 ммоль, 0.057 г). R_f 0.46 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (DMSO-d6): 7.51-7.13 (16H, м, H6-Thy, Tr), 5.99 (1H, д. д, J 9.6, 2.0, H6'), 4.34-4.23 (1H, м, H2'), 3.18-2.99 (4H, м, 2'-*CH*₂OH, H5', H3'), 2.89 (6H, кв, J 6.7, CH₂(Et₃N)), 1.67 (3H, с, CH₃-

Thy), 1.45-1.28 (2H, м, H3', H5'), 1.10 (9H, т, *J* 7.2, CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (DMSOd6): 0.33 (c); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₉H₂₉N₃O₇P вычислено 562.174, найдено 561.893.

2'-О-Фосфометил-4'-N-тритил-6'-(N⁶-бензоиладенин-9-ил)морфолин (соединение 3.135). Выход составил 82 % (0.082 ммоль, 0.063 г). R_f 0.54 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (DMSO-d6): 8.73 (1H, c, H8-Ade), 8.44 (1H, c, H2-Ade), 8.02 (2H, каж.д, *J* 7.0, Bz), 7.67-7.11 (18H, м, Bz, Tr), 6.40 (1H, дд, *J* 9.7, 1.7, H6'), 4.48-4.37 (1H, м, H2'), 3.38-3.11 (4H, м, 2'-*CH*₂OH, H5', H3'), 2.89 (6H, кв, *J* 7.2, CH₂(Et₃N)), 2.09 (1H, уш.т, *J* 10.5, H3'), 1.45 (1H, уш.т, *J* 11.2, H5'), 1.08 (9H, т, *J* 7.2, CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (DMSO-d6): 0.35 (c); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₃₆H₃₂N₆O₆P вычислено 675.212, найдено 674.991.

2'-О-Фосфометил-4'-N-тритил-6'-(N⁴-бензоилцитозин-1-

ил)морфолин (соединение 3.136). Выход составил 75 % (0.075 ммоль, 0.056 г). R_f 0.48 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР 8.00-7.94 (2H, м, Bz), 7.92 (1H, д, J 7.6, H6-Cyt), 7.61 (1H, тт, J 7.2, 2.1, Bz), 7.54-7.15 (18H, м, H5-Cyt, Bz, Tr), 6.11 (1H, дд, J 9.1, 1.9, H6'), 4.41-4.30 (1H, м, H2'), 3.38-3.06 (4H, м, 2'-*CH*₂OH, H5', H3'), 2.91 (6H, кв, J 7.2, 3CH₂(Et₃N)), 1.57 (1H, уш.т, J 10.9, H3'), 1.30-1.21 (1H, м, H5'), 1.11 (9H, т, J 7.2, 3CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (DMSO-d6): 0.43 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₃₅H₃₂N₄O₇P вычислено 651.201, найдено 650.992.

2'-О-Фосфометил-4'-N-тритил-6'-(N²-изобутирилгуанин-9-

ил)морфолин (соединение 3.137). Выход составил 76 % (0.076 ммоль, 0.057 г). R_f 0.39 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.53-7.04 (16H, м, H8-Gua, Tr), 5.88-5.76 (1H, м, H6'), 4.42-4.18 (1H, м, H2'), 3.99-3.71 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.35-3.12 (2H, м, H5', H3'), 2.95 (6H, кв, *J* 7.2, CH₂(Et₃N)), 2.85-2.74 (1H, м, CH-*i*Bu), 1.89-1.75 (1H, м, H3'), 1.58-1.46 (1H, м, H5'), 1.30-1.05 (15H, м, CH₃(Et₃N), CH₃-*i*Bu); ³¹P-ЯМР (CDCl₃): 1.69 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₃₃H₃₄N₆O₇P вычислено 657.223, найдено 657.092.

2'-О-Фосфометил-4'-Л-тритил-6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолин

(соединение 3.141). Выход составил 81 % (0.081 ммоль, 0.055 г). R_f 0.45 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 7.79 (1H, c, H6-Ura), 7.51-7.12 (15H, м, Tr), 6.00 (1H, дд, J9.3, 1.8, H6'), 4.42-4.30 (1H, м, H2'), 3.68 (2H, уш.т., J 5.7, 2'-*CH*₂OH), 3.25-3.13 (2H, м, H5', H3'), 3.06 (6H, кв, J 7.3, CH₂(Et₃N)), 1.45-1.28 (2H, м, H5', H3'), 1.18 (9H, т, J 7.3, CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 0.93 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₆IN₃O₇P вычислено 674.06. найдено 673.99.

2'-О-Фосфометил-4'-*N***-тритил-6'-(5-бромурацил-1-ил)морфолин** (соединение 3.142). Выход составил 63 % (0.063 ммоль, 0.045 г). R_f 0.41 (*i*PrOH–конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 7.76 (1H, c, H6-Ura), 7.48-7.12 (15H, м, Tr), 6.02 (1H, дд, *J* 9.8, 2.3, H6'), 4.41-4.31 (1H, м, H2'), 4.26-4.19 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.95-3.84 (2H, м, H5', H3'), 3.34 (1H, каж.т, *J* 11.3, H5'), 3.21 (1H, уш.д, *J* 11.6, H3'), 3.06 (6H, кв, *J* 7.3, 3CH₂(Et₃N)), 1.17 (9H, т, *J* 7.2, 3CH₃(Et₃N)); ³¹P-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 3.68 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₆BrN₃O₇P вычислено 626.07, найдено 626.06.

2'-О-Фосфометил-4'-*N***-тритил-6'-(5-хлорурацил-1-ил)морфолин** (соединение 3.143). Выход составил 90 % (0.09 ммоль, 0.061 г). R_f 0.46 (*i*PrOH– конц. водн. аммиак–H₂O, 7:1:2); ¹H-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 7.57-7.10 (16H, м, H6-Ura, Tr), 6.04 (1H, д.д, *J* 9.6, 2.1, H6'), 3.61-3.45 (2H, м, 2'-*CH*₂OH), 3.13 (1H, каж.д, *J* 11.2, H5'), 3.02 (1H, каж.д, *J* 11.6, H3'), 1.44-1.26 (2H, м, H5', H3'); ³¹P-ЯМР (D₂O/CD₃CN): 4.71 (с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₈H₂₆ClN₃O₇P вычислено 582.120, найдено 582.192.

4.2.9. Синтез производных АДФ серии IIIa

Общая методика синтеза соединений 3.125-3.132 (Схема 3.19).

Синтез конъюгатов АДФ **3.125-3.132** проводили аналогично синтезу соединения **3.1** (способ 2, Раздел 4.2.1) путем активации монофосфатов морфолиновых нуклеозидов **3.113-3.140** (0.05 ммоль) и последующем

использовании интермедиатов **3.159-3.166** *in situ* в реакции с АМФ (0.2 ммоль).

В случае синтеза конъюгатов **3.127-3.129** по завершении реакции конденсации к реакционной смеси добавляли конц. водн. раствор NH₃ (2 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение 12 ч. Затем реакционную смесь упаривали до объема DMI (1 мл).

<u>Общая методика очистки соединений **3.167-3.174**</u>. Реакционную смесь осаждали добавлением Et₂O (20 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали Et₂O (2×3 мл) и сушили на воздухе. Продукты реакции разделяли методом OФX в линейном градиенте концентрации MeCN (0 \rightarrow 50 %) в 0.1 М NH₄HCO₃/H₂O. Общий объем элюента 200 мл. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали.

Детритилирование конъюгатов **3.167-3.174.** К остатку после упаривания добавляли водный раствор 80 % AcOH (0.5 мл). Реакцию проводили в течение 1 ч. Затем реакционную смесь осаждали добавлением ацетона (10 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в воде (0.5 мл) и осаждали добавлением раствора 4 % NaClO₄ в ацетоне (10 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном (2×5 мл) и сушили на воздухе. Пирофосфаты **3.125-3.132** получены в виде Na⁺ солей.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(урацил-1-ил)-морфолин-2'-*O*метил]пирофосфат} (соединение 3.125). ¹H-ЯМР (D₂O): 8.41 (1H, c, H2-Ade), 8.13 (1H, c, H8-Ade), 7.56 (1H, д, *J* 7.8, H6-Ura), 6.01 (1H, д, *J* 3.8, H1'-rA), 5.66 (1H, уш.д, *J* 10.0, H6'), 5.59 (1H, д, *J* 7.8, H5-Ura), 4.27-4.00 (8H, м, H4'-rA, H5'rA, H2', 2'-*CH*₂OH, H2'-rA, H3'-rA), 3.26 (2H, каж.д, *J* 12.2, H5', H3'), 2.96 (1H, т, *J* 11.9, H5'), 2.86 (1H, т, *J* 11.3, H3'); ³¹P-ЯМР (D₂O): -11.35 – (-11.49) (м).

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(тимин-1-ил)морфолин-2'-*O*метил]пирофосфат} (соединение 3.126). ¹H-ЯМР (D₂O): 8.35 (1H, c, H2-Ade), 8.06 (1H, c, H8-Ade), 7.30 (1H, c, H6-Ura), 5.92 (1H, д, *J* 6.08, H1'-rA), 5.55 (1H, дд, *J* 10.5, 2.6, H6'), 4.53 (1H, т, *J* 5.5, H2'-rA), 4.36 (1H, дд, *J* 5.1, 3.4, H3'-rA), 4.21-3.99 (4H, м, H4'-rA, H2'-rA, 2'-*CH*₂OH), 3.66-3.53 (2H, м, H5'-rA), 3.17-3.07 (2H, м, H5', H3'), 2.77-2.63 (2H, м, H5', H3'), 1.63 (3H, с, CH₃-Thy); ³¹P-ЯМР (D₂O): -11.48 (уш.с); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₀H₂₇N₈O₁₃P₂ вычислено 649.117, найдено 648.792.

Аденозин-5'-О-{β-[6'-(аденин-9-ил)морфолин-2'-О-

метил]пирофосфат} (соединение 3.127). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.14 (1H, c, H2-Ade), 8.06 (1H, c, H2-Ade), 8.02 (1H, c, H8-Ade), 7.89 (1H, c, H8-Ade), 5.96 (1H, дд, *J* 7.8, 5.6, H6'), 5.77 (1H, д, *J* 5.3, H1'-rA), 4.45 (1H, уш.д, *J* 11.0, H2'-rA), 4.38 (1H, т, *J* 4.9, H3'-rA), 4.29 (1H, т, *J* 4.1, H2'-rA), 4.26-4.09 (5H, м, H5'-rA, H4'-rA, 2'-CH₂OH), 3.58-3.44 (3H, м, H5', H3'), 3.27 (1H, т, *J* 12.3, H3'); ³¹P-ЯМР (D₂O): -11.23 – (-11.83) (м); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₀H₂₆N₁₁O₁₁P₂ вычислено 658.129, найдено 657.892.

Аденозин-5'-О-{β-[6'-(цитозин-1-ил)морфолин-2'-О-

метил]пирофосфат} (соединение 3.128). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.32 (1H, c, H2-Ade), 8.04 (1H, c, H8-Ade), 7.38 (1H, д, *J* 7.5, H6-Cyt), 5.95 (1H, д, *J* 5.9, H1'-rA), 5.68 (1H, дд, *J* 10.4, 2.2, H6'), 5.63 (1H, д, *J* 7.6, H6-Cyt), 4.58 (1H, т, *J* 5.1, H2'-rA), 4.38 (1H, каж.т, *J* 3.6, H3'-rA), 4.29-4.00 (6H, м, H4'-rA, H5'-rA, H2', 2'-*CH*₂OH), 3.35-3.28 (2H, м, H5', H3'), 3.02 (1H, т, *J* 12.3, H5'), 2.80 (1H, дд, *J* 13.7, 10.7, H3'); ³¹P-ЯМР (D₂O): -11.35 – (-11.49) (м).

Аденозин-5'-О-{β-[6'-(гуанин-9-ил)морфолин-2'-О-

метил]пирофосфат} (соединение 3.129). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.17 (1H, c, H2-Ade), 8.04 (1H, c, H8-Ade), 7.75 (1H, c, H8-Gua), 5.80 (1H, д, *J* 5.8, H1'-rA), 5.73 (1H, дд, *J* 10.2, 2.9, H6'), 4.42-4.35 (2H, м, H2'-rA, H3'-rA), 4.31-4.09 (6H, м, H4'-rA, H5'-rA, H2', 2'-*CH*₂OH), 3.53-3.45 (3H, м, H5', H3'), 3.28 (1H. каж.т, *J* 12.2, H5'); ³¹Р-ЯМР (D₂O): -11.37 – (-11.80) (м).

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолин-2'-*O*метил]пирофосфат} (соединение 3.130). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.52 (1H, c, H2-Ade), 8.26 (1H, c, H8-Ade), 8.06 (1H, c, H6-Ura), 6.12 (1H, д, *J* 5.7, H1'-rA), 5.84 (1H, дд, *J* 10.6, 2.3, H6'), 4.63 (1H, т, *J* 5.3, H2'-rA), 4.48 (1H, дд, *J* 4.9, 3.7, H3'-rA), 4.16-4.45 (6H, м, H4'-rA, H5'-rA, H2'-rA, 2'-*CH*₂OH), 3.51 (2H, т, *J* 11.3, H5', H3'), 3.22 (1H, т, *J* 12.4, H5'), 3.10 (1H, дд, *J* 12.6, 10.9, H3'); ³¹Р-ЯМР (D₂O): -10.86 – (-11.28) (м); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₄IN₈O₁₃P₂ вычислено 761.01 найдено 761.09.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(5-бромурацил-1-ил)морфолин-2'-*O*метил]пирофосфат} (соединение 3.131). ¹Н-ЯМР (D₂O): 8.49 (1H, c, H2-Ade), 8.23 (1H, c, H8-Ade), 8.02 (1H, c, H6-Ura), 6.09 (1H, д, *J* 5.7, H1'-rA), 5.83 (1H, дд, *J* 10.5, 2.4, H6'), 4.63 (1H, т, *J* 5.3, H2'-rA), 4.47 (1H, дд, *J* 4.8, 3.7, H3'-rA), 4.15-4.44 (6H, м, H4'-rA, H5'-rA, H2', 2'-*CH*₂OH), 3.51 (2H, т, *J* 11.3, H5', H3'), 3.22 (1H, дд, *J* 12.6, 11.8, H5'), 3.07 (1H, дд, *J* 12.6, 10.8, H3); ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.91 – (-11.24) (м); масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₄BrN₈O₁₃P₂ вычислено 713.02, найдено 712.99.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(5-хлорурацил-1-ил)морфолин-2'-*O*метил]пирофосфат} (соединение 3.132). ¹H-ЯМР (D₂O): 8.57 (1H, c, H2-Ade), 8.38 (1H, c, H8-Ade), 8.04 (1H, c, H6-Ura), 6.12 (1H, д, *J* 5.6, H1'-rA), 5.92 (1H, дд, *J* 10.6, 2.3, H6'),4.68 (1H, т, *J* 5.3, H2'-rA), 4.50 (1H, дд, *J* 5.0, 3.6, H3'-rA), 4.15-4.47 (6H, м, H4'-rA, H5'-rA, H2', 2'-*CH*₂OH), 3.55 (2H, д, *J* 13.0, H5', H3'), 3.25 (1H, т, *J* 12.3, H5'), 3.16 (1H, дд, *J* 12.5, 11.1, H3'); ³¹P-ЯМР (D₂O): -10.52 – (-11.46) (м); масс-спектр MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₂₆ClN₈O₁₃P₂ вычислено 671.08, найдено 671.01.

4.2.10. Синтез производных АДФ серии IIIб

Синтез 2'-аминометил-4'-*N*-тритил-6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолина (соединение 3.179)

Соединение **3.179** синтезировали исходя из 2'-гидроксиметил-4'-*N*-тритил-6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолина **3.141** аналогично протоколу [237]. Выход соединения **3.179** составил 5 % (0.1 ммоль). ¹Н-ЯМР (DMSO-d₆): 7.83 (1H, с, H6-Ura), 7.41 (6H, уш.с, Tr), 7.31 (6H, т, *J* 7.2, Tr), 7.19 (3H, каж.т, *J* 6.8, Tr), 5.95 (1H, дд, *J* 9.4, 1.4, H6'), 4.15-4.07 (1H, м, H2'), 3.19 (1H, каж.д, *J* 11.1, H5'), 3.02 (1H, каж.д, *J* 11.5, H3'), 2.68-2.58 (2H, м, 2'-*CH*₂NH₂), 1.42-1.32 (2H,

м, H3', H5'); ¹³С-ЯМР (DMSO-d₆): 160.42, 149.56, 144.20, 128.86, 127.75, 126.24, 80.49, 77.34, 76.18, 69.56, 51.61, 49.55, 43.37.

Общая методика синтеза конъюгатов 3.179-3.192 (Схема 3.21)

н-Ви₃NH⁺ соль АДФ получали аналогично АМФ (Раздел 4.2.1). АДФ (0.02 ммоль, *н*-Ви₃NH⁺ соль) растворяли в DMSO. К полученному раствору добавляли Ph₃P (0.06 ммоль, 16 мг), (PyS)₂ (0.06 ммоль, 13 мг) и *N*-MeIm (0.24 ммоль, 0.02 мл). *н*-Ви₃NH⁺ соль АДФ получали аналогично АМФ (Раздел 4.2.1). АДФ (0.01 ммоль, *н*-Ви₃NH⁺ соль) растворяли в DMI (0.1 мл). К полученному раствору добавляли Ph₃P (0.03 ммоль, 8 мг), (PyS)₂ (0.03 ммоль, 6.5 мг) и *N*-MeIm (0.24 ммоль, 0.01 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин. Отдельно готовили раствор 2'-аминометилморфолинового нуклеозида **3.89/3.90** или **3.176-3.179** (0.022 ммоль) в DMI (0.1 мл) с добавлением *н*-Ви₃N (0.005 мл). Полученный раствор добавляли к реакционной смеси активации АДФ. Реакцию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре.

В случае синтеза конъюгатов **3.183-3.185** по завершении реакции конденсации интермедиата АДФ **3.180** с аминопроизводными **3.176-3.178** к реакционной смеси добавляли конц. водн. раствор NH₃ (1 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение 12 ч. Затем реакционную смесь упаривали до объема DMI (0.1 мл).

<u>Общая методика очистки соединений **3.181-3.186**</u>. Реакционную смесь осаждали добавлением Et_2O (2 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали Et_2O (2×1 мл) и сушили на воздухе. Продукты реакции разделяли методом ОФХ в линейном градиенте концентрации MeCN (0→50 %) в 0.1 М NH₄HCO₃/H₂O. Общий объем элюента 100 мл. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали.

<u>Детритилирование конъюгатов **3.181-3.186.**</u> К остатку после упаривания добавляли водный раствор 80 % AcOH (0.5 мл). Реакцию проводили в течение 1 ч. Затем реакционную смесь осаждали добавлением ацетона (10 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием.

Осадок растворяли в воде (0.5 мл) и осаждали добавлением раствора 4 % NaClO₄ в ацетоне (10 мл). Суспензию охлаждали (2 ч, -20 °C), осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном (2×5 мл) и сушили на воздухе. Пирофосфаты **3.187-3.192** получены в виде Na⁺ солей.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(урацил-1-ил)морфолин-2'-*N*аминометил]пирофосфат} (соединение 3.187). Масс-спектр MALDI TOF (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₂₈N₉O₁₂P₂ вычислено 636.113, найдено 636.055.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(тимин-1-ил)морфолин-2'-*N*аминометил]пирофосфат} (соединение 3.188). Масс-спектр MALDI TOF (m/z): [M+H]⁺ C₂₀H₃₀N₉O₁₂P₂ вычислено 650.149, найдено 650.031.

Аденозин-5'-О-{β-[6'-(аденин-9-ил)морфолин-2'-N-

аминометил]пирофосфат} (соединение 3.189). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ С₂₀H₂₇N₁₂O₁₀P₂ вычислено 657.145, найдено 656.992.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(цитозин-1-ил)морфолин-2'-*N*аминометил]пирофосфат} (соединение 3.190). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₇N₁₀O₁₁P₂ вычислено 633.134, найдено 633.432.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(гуанин-9-ил)морфолин-2'-*N*аминометил]пирофосфат} (соединение 3.191). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₂₀H₂₇N₁₂O₁₁P₂ вычислено 673.140, найдено 673.435.

Аденозин-5'-*O*-{β-[6'-(5-иодурацил-1-ил)морфолин-2'-*N*аминометил]пирофосфат} (соединение 3.192). Масс-спектр ESI (m/z): [M-H]⁻ C₁₉H₂₅IN₉O₁₂P₂ вычислено 760.014, найдено 760.189.

выводы

- Осуществлен дизайн и синтез трех серий ингибиторов ПАРП 1, имитируюших субстрат ПАРП 1 НАД+. Первая (I) и вторая (II) серии миметиков НАД+ содержат производные ароматических карбоновых кислот и морфолиновые аналоги нуклеозидов, присоединенные к концевому фосфату АДФ через алифатическую линкерную группу. Третья серия (III) основана на непосредственном присоединении морфолиновых аналогов нуклеозидов к молекуле АДФ через фосфоэфирную или фосфамидную связи. Предложенные соединения являются умеренными ингибиторами ПАРП 1, IC₅₀ 40-474 мкМ.
- 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 рН в диапазоне 8.5-9 на стадии образования основания Шиффа;
 - использование I₂/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

~ 143 ~

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lupo B., Trusolino L. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: old and new paradigms revisited // Biochim. Biophys. Acta. - 2014. - V. 1846. - № 1.
 - P. 201-215.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. V. 7. № 7. P. 517-528.
- Weaver A.N., Yang E.S. Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer // Front. Oncol. - 2013. - V. 3. - P. 290-300.
- Curtin N.J., Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond // Mol. Aspects Med. - 2013. - V. 34. - № 6. - P. 1217-1256.
- Ohmoto A., Yachida S. Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions // Onco. Targets Ther. - 2017. - V. 10. - P. 5195-5208.
- Ferraris D.V. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic // J. Med. Chem. - 2010. - V. 53. - № 12. -P. 4561-4584.
- Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair // Mol. Biol. (Mosk). 2016. V. 50. № 4. P. 655-673.
- Clark J.B., Ferris G.M., Pinder S. Inhibition of nuclear NAD nucleosidase and poly ADP-ribose polymerase activity from rat liver by nicotinamide and 5'methyl nicotinamide // Biochim. Biophys. Acta. - 1971. - V. 238. - № 1. - P. 82-85.
- 9. Yuan Z., Chen J., Li W., Li D., Chen C., Gao C., Jiang Y. PARP inhibitors as antitumor agents: a patent update (2013-2015) // Expert. Opin. Ther. Pat. 2017. V. 27. № 3. P. 363-382.
- Zhou Q., Ji M., Zhou J., Jin J., Xue N., Chen J., Xu B., Chen X. Poly (ADPribose) polymerases inhibitor, Zj6413, as a potential therapeutic agent against breast cancer // Biochem. Pharmacol. - 2016. - V. 107. - P. 29-40.
- Wang B., Chu D., Feng Y., Shen Y., Aoyagi-Scharber M., Post L.E. Discovery and characterization of (8*S*,9*R*)-5-fluoro-8-(4-fluorophenyl)-9-(1-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)-2,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrido[4,3,2-de]phthalazin-3-one (BMN 673, Talazoparib), a novel, highly potent, and orally efficacious poly(ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitor, as an anticancer agent // J. Med. Chem. 2016. V. 59. № 1. P. 335-357.
- Efremova A.S., Zakharenko A.L., Shram S.I., Kulikova I.V., Drenichev M.S., Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Myasoedov N.F., Lavrik O.I., Mikhailov S.N. Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1 // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. - 2013. - V. 32. - № 9. - P. 510-528.
- Li H., Hu Y., Wang X., He G., Xu Y., Zhu Q. Novel tricyclic poly (ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis and biological evaluation // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. № 19. P. 4731-4740.
- Oplustil O'Connor L., Rulten S.L., Cranston A.N., Odedra R., Brown H., Jaspers J.E., Jones L., Knights C., Evers B., Ting A., Bradbury R.H., Pajic M., Rottenberg S., Jonkers J., Rudge D., Martin N.M., Caldecott K.W., Lau A., O'Connor M.J. The PARP inhibitor AZD2461 provides insights into the role of PARP3 inhibition for both synthetic lethality and tolerability with chemotherapy in preclinical models // Cancer Res. 2016. V. 76. № 20. P. 6084-6094.
- 15. Chen L., Gao G., Felczak K., Bonnac L., Patterson S.E., Wilson D., Bennett E.M., Jayaram H.N., Hedstrom L., Pankiewicz K.W. Probing binding requirements of type I and type II isoforms of inosine monophosphate dehydrogenase with adenine-modified nicotinamide adenine dinucleotide analogues // J. Med. Chem. 2007. V. 50. № 23. P. 5743-5751.

- 16. Felczak K., Chen L., Wilson D., Williams J., Vince R., Petrelli R., Jayaram H.N., Kusumanchi P., Kumar M., Pankiewicz K.W. Cofactor-type inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase via modular approach: targeting the pyrophosphate binding sub-domain // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 19. № 5. P. 1594-1605.
- Felczak K., Vince R., Pankiewicz K.W. NAD-based inhibitors with anticancer potential // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2014. - V. 24. - № 1. - P. 332-336.
- Bonnac L., Chen L., Pathak R., Gao G., Ming Q., Bennett E., Felczak K., Kullberg M., Patterson S.E., Mazzola F., Magni G., Pankiewicz K.W. Probing binding requirements of NAD kinase with modified substrate (NAD) analogues // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2007. - V. 17. - № 6. - P. 1512-1515.
- Pergolizzi G., Cominetti M.M., Butt J.N., Field R.A., Bowater R.P., Wagner G.K. Base-modified NAD and AMP derivatives and their activity against bacterial DNA ligases // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. № 22. P. 6380-6398.
- Wang S., Zhu W., Wang X., Li J., Zhang K., Zhang L., Zhao Y.J., Lee H.C., Zhang L. Design, synthesis and SAR studies of NAD analogues as potent inhibitors towards CD38 NADase // Molecules. - 2014. - V. 19. - № 10. - P. 15754-15767.
- 21. Fischbarg J. Diquafosol tetrasodium. Inspire/Allergan/Santen // Curr. Opin.
 Investig. Drugs. 2003. V. 4. № 11. P. 1377-1383.
- Accurso F.J., Moss R.B., Wilmott R.W., Anbar R.D., Schaberg A.E., Durham T.A., Ramsey B.W., Group T.-I.S. Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2011. V. 183. № 5. P. 627-634.
- 23. Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases // Nat. Rev. Drug Discov. 2013. V. 12. № 6. P. 447-464.
- 24. Maffioli S.I., Zhang Y., Degen D., Carzaniga T., Del Gatto G., Serina S., Monciardini P., Mazzetti C., Guglierame P., Candiani G., Chiriac A.I.,

- 25. Pivazyan A.D., Birks E.M., Wood T.G., Lin T.S., Prusoff W.H. Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine // Biochem. Pharmacol. 1992. V. 44. № 5. P. 947-953.
- 26. Tanaka Y., Matsunami N., Yoshihara K. Inhibition of ADP-ribosylation of histone by diadenosine 5', 5"' -p (1), p(4)-tetraphosphate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 99. № 3. P. 837-843.
- 27. Toledano E., Ogryzko V., Danchin A., Ladant D., Mechold U. 3'-5' Phosphoadenosine phosphate is an inhibitor of PARP-1 and a potential mediator of the lithium-dependent inhibition of PARP-1 in vivo // Biochem. J. - 2012. - V. 443. - № 2. - P. 485-490.
- 28. Jagtap P.G., Southan G.J., Baloglu E., Ram S., Mabley J.G., Marton A., Salzman A., Szabo C. The discovery and synthesis of novel adenosine substituted 2,3-dihydro-1H-isoindol-1-ones: potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. № 1. P. 81-85.
- Luo X., Kraus W.L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1 // Genes Dev. 2012. V. 26. № 5. P. 417-432.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // Biochem. J. - 1999. - V. 342 (Pt 2). - P. 249-268.
- Hassa P.O., Hottiger M.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases // Front. Biosci. - 2008. - V. 13. - P. 3046-3082.
- 32. Penning T.D. Small-molecule PARP modulators--current status and future therapeutic potential // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2010. V. 13. № 5. P. 577-586.

- Jones P. Development of poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) inhibitors in oncology // Annu. Rep. Med. Chem. - 2010. - V. 45. - P. 229-243.
- 34. Maxwell K.N., Domchek S.M. Cancer treatment according to *BRCA1* and *BRCA2* mutations // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2012. V. 9. № 9. P. 520-528.
- Kummar S., Chen A., Parchment R.E., Kinders R.J., Ji J., Tomaszewski J.E., Doroshow J.H. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer // BMC Med. - 2012. - V. 10. - P. 25-29.
- Davar D., Beumer J.H., Hamieh L., Tawbi H. Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy // Curr. Med. Chem. 2012. V. 19. № 23. P. 3907-3921.
- 37. Ekblad T., Camaioni E., Schuler H., Macchiarulo A. PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition // FEBS J. 2013. V. 280. № 15. P. 3563-3575.
- 38. Strom C.E., Helleday T. Strategies for the Use of Poly(adenosine diphosphate ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Cancer Therapy // Biomolecules. 2012. V. 2. № 4. P. 635-649.
- 39. Purnell M.R., Whish W.J. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase //
 Biochem. J. 1980. V. 185. № 3. P. 775-777.
- 40. Durkacz B.W., Omidiji O., Gray D.A., Shall S. (ADP-ribose)n participates in DNA excision repair // Nature. 1980. V. 283. № 5747. P. 593-596.
- 41. Lubisch W., Kock M., Höger T., Schult S., Grandel R., Müller R. Substituted benzimidazoles and their use as parp inhibitors // US patent № 6448271 B1. 2002.
- Penning T.D., Zhu G.D., Gandhi V.B., Gong J., Thomas S., Lubisch W., Grandel R., Wernet W., Park C.H., Fry E.H., Liu X., Shi Y., Klinghofer V., Johnson E.F., Donawho C.K., Frost D.J., Bontcheva-Diaz V., Bouska J.J., Olson A.M., Marsh K.C., Luo Y., Rosenberg S.H., Giranda V.L. Discovery and SAR of 2-(1-propylpiperidin-4-yl)-1*H*-benzimidazole-4-carboxamide: a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) for the treatment of cancer // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. № 14. P. 6965-6975.

- 43. Zhu G.D., Gandhi V.B., Gong J., Thomas S., Luo Y., Liu X., Shi Y., Klinghofer V., Johnson E.F., Frost D., Donawho C., Jarvis K., Bouska J., Marsh K.C., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Penning T.D. Synthesis and SAR of novel, potent and orally bioavailable benzimidazole inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) with a quaternary methylene-amino substituent // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. № 14. P. 3955-3958.
- 44. Donawho C.K., Luo Y., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., Ghoreishi-Haack N.S., Grimm D.R., Guan R., Han E.K., Holley-Shanks R.R., Hristov B., Idler K.B., Jarvis K., Johnson E.F., Kleinberg L.R., Klinghofer V., Lasko L.M., Liu X., Marsh K.C., McGonigal T.P., Meulbroek J.A., Olson A.M., Palma J.P., Rodriguez L.E., Shi Y., Stavropoulos J.A., Tsurutani A.C., Zhu G.D., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Frost D.J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models // Clin. Cancer Res. -2007. - V. 13. - № 9. - P. 2728-2737.
- Penning T.D., Zhu G.D., Gandhi V.B., Gong J., Liu X., Shi Y., Klinghofer V., Johnson E.F., Donawho C.K., Frost D.J., Bontcheva-Diaz V., Bouska J.J., Osterling D.J., Olson A.M., Marsh K.C., Luo Y., Giranda V.L. Discovery of the Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1*H*-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer // J. Med. Chem. 2009. V. 52. № 2. P. 514-523.
- 46. Papeo G., Forte B., Orsini P., Perrera C., Posteri H., Scolaro A., Montagnoli A. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cancer therapy: are we close to maturity? // Expert. Opin. Ther. Pat. 2009. V. 19. № 10. P. 1377-1400.
- 47. Mariano G., Ricciardi M.R., Trisciuoglio D., Zampieri M., Ciccarone F., Guastafierro T., Calabrese R., Valentini E., Tafuri A., Del Bufalo D., Caiafa P., Reale A. PARP inhibitor ABT-888 affects response of MDA-MB-231 cells

to doxorubicin treatment, targeting Snail expression // Oncotarget. - 2015. -V. 6. - № 17. - P. 15008-15021.

- 48. Jones P., Altamura S., Boueres J., Ferrigno F., Fonsi M., Giomini C., Lamartina S., Monteagudo E., Ontoria J.M., Orsale M.V., Palumbi M.C., Pesci S., Roscilli G., Scarpelli R., Schultz-Fademrecht C., Toniatti C., Rowley M. Discovery of 2-{4-[(3S)-piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor efficacious in *BRCA*-1 and -2 mutant tumors // J. Med. Chem. 2009. V. 52. № 22. P. 7170-7185.
- 49. Murai J., Huang S.Y., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors // Cancer Res. - 2012. - V. 72. - № 21. - P. 5588-5599.
- 50. Bridges K.A., Toniatti C., Buser C.A., Liu H., Buchholz T.A., Meyn R.E. Niraparib (MK-4827), a novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, radiosensitizes human lung and breast cancer cells // Oncotarget. - 2014. - V. 5. - № 13. - P. 5076-5086.
- 51. Engert F., Schneider C., Weibeta L.M., Probst M., Fulda S. PARP Inhibitors Sensitize Ewing Sarcoma Cells to Temozolomide-Induced Apoptosis via the Mitochondrial Pathway // Mol. Cancer Ther. - 2015. - V. 14. - № 12. - P. 2818-2830.
- 52. Genther Williams S.M., Kuznicki A.M., Andrade P., Dolinski B.M., Elbi C., O'Hagan R.C., Toniatti C. Treatment with the PARP inhibitor, niraparib, sensitizes colorectal cancer cell lines to irinotecan regardless of MSI/MSS status // Cancer Cell Int. - 2015. - V. 15. - № 1. - P. 14-24.
- 53. Watson C.Y., Whish W.J.D., Threadgill M.D. Synthesis of 3-substituted benzamides and 5-substituted isoquinolin-1(2H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) // Bioorg. Med. Chem. 1998. V. 6. № 6. P. 721-734.
- 54. Suto M.J., Turner W.R., Arundel-Suto C.M., Werbel L.M., Sebolt-Leopold J.S. Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of

potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // Anticancer Drug Des. -1991. - V. 6. - № 2. - P. 107-117.

- 55. Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 3. P. 1569-1575.
- 56. Martin N.M.B., Smith G.C.M., White C.R., Newton R.F., Douglas D.G., Eversley P.J., Whittle A.J. Isoquinolinone derivatives // US patent № 6664269 B2. - 2003.
- 57. Martin N.M.B., Smith G.C.M., Eversley P.J., Cockcroft X.L., Kerrigan F., Hoare J., Dixon L. Phthalazinone derivatives // US patent № 7196085 B2-2007.
- 58. Jacobs R.T., Folmer J.J., Simpson T.R., Chaudhari B., Frazee W.J., Davenport T.W., Sundarababu G. Therapeutic heterocycles // US patent № 6399603 B1.
 2002.
- 59. Loh V.M., Jr., Cockcroft X.L., Dillon K.J., Dixon L., Drzewiecki J., Eversley P.J., Gomez S., Hoare J., Kerrigan F., Matthews I.T., Menear K.A., Martin N.M., Newton R.F., Paul J., Smith G.C., Vile J., Whittle A.J. Phthalazinones. Part 1: the design and synthesis of a novel series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. Nº 9. P. 2235-2238.
- Cockcroft X.L., Dillon K.J., Dixon L., Drzewiecki J., Kerrigan F., Loh V.M., Jr., Martin N.M., Menear K.A., Smith G.C. Phthalazinones 2: optimisation and synthesis of novel potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2006. - V. 16. - № 4. - P. 1040-1044.
- Menear K.A., Adcock C., Boulter R., Cockcroft X.L., Copsey L., Cranston A., Dillon K.J., Drzewiecki J., Garman S., Gomez S., Javaid H., Kerrigan F., Knights C., Lau A., Loh V.M., Jr., Matthews I.T., Moore S., O'Connor M.J., Smith G.C., Martin N.M. 4-[3-(4-Cyclopropanecarbonylpiperazine-1carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin- 1-one: a novel bioavailable

inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1 // J. Med. Chem. - 2008. - V. 51.
- № 20. - P. 6581-6591.

- Rouleau M., Patel A., Hendzel M.J., Kaufmann S.H., Poirier G.G. PARP inhibition: PARP1 and beyond // Nat. Rev. Cancer. - 2010. - V. 10. - № 4. -P. 293-301.
- 63. Liu J.F., Tolaney S.M., Birrer M., Fleming G.F., Buss M.K., Dahlberg S.E., Lee H., Whalen C., Tyburski K., Winer E., Ivy P., Matulonis U.A. A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer // Eur. J. Cancer. 2013. V. 49. № 14. P. 2972-2978.
- 64. Ledermann J., Harter P., Gourley C., Friedlander M., Vergote I., Rustin G., Scott C.L., Meier W., Shapira-Frommer R., Safra T., Matei D., Fielding A., Spencer S., Dougherty B., Orr M., Hodgson D., Barrett J.C., Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by *BRCA* status in a randomised phase 2 trial // Lancet. Oncol. 2014. V. 15. Nº 8. P. 852-861.
- 65. Bixel K., Hays J.L. Olaparib in the management of ovarian cancer // Pharmgenomics Pers. Med. 2015. V. 8. P. 127-135.
- 66. Kim Y., Kim A., Sharip A., Sharip A., Jiang J., Yang Q., Xie Y. Reverse the resistance to PARP inhibitors // Int. J. Biol. Sci. - 2017. - V. 13. - № 2. - P. 198-208.
- Menear K.A., Javaid M.H., Gomez S., Hummersone M.G., Lence C.F., Martin N.M.B., Rudge D.A., Roberts C.A., Blades K. Phthalazinone derivatives // Patent № WO2009093032. 2009.
- Jaspers J.E., Kersbergen A., Boon U., Sol W., van Deemter L., Zander S.A., Drost R., Wientjens E., Ji J., Aly A., Doroshow J.H., Cranston A., Martin N.M., Lau A., O'Connor M.J., Ganesan S., Borst P., Jonkers J., Rottenberg S.

Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in *BRCA1*-mutated mouse mammary tumors // Cancer Discov. - 2013. - V. 3. - № 1. - P. 68-81.

- 69. Williams R. Discontinued drugs in 2011: oncology drugs // Expert Opin. Investig. Drugs. - 2013. - V. 22. - № 1. - P. 9-34.
- 70. Skalitzky D.J., Marakovits J.T., Maegley K.A., Ekker A., Yu X.H., Hostomsky Z., Webber S.E., Eastman B.W., Almassy R., Li J., Curtin N.J., Newell D.R., Calvert A.H., Griffin R.J., Golding B.T. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors // J. Med. Chem. - 2003. - V. 46. - № 2. - P. 210-213.
- Canan Koch S.S., Thoresen L.H., Tikhe J.G., Maegley K.A., Almassy R.J., Li J., Yu X.H., Zook S.E., Kumpf R.A., Zhang C., Boritzki T.J., Mansour R.N., Zhang K.E., Ekker A., Calabrese C.R., Curtin N.J., Kyle S., Thomas H.D., Wang L.Z., Calvert A.H., Golding B.T., Griffin R.J., Newell D.R., Webber S.E., Hostomsky Z. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure // J. Med. Chem. 2002. V. 45. № 23. P. 4961-4974.
- 72. Tikhe J.G., Webber S.E., Hostomsky Z., Maegley K.A., Ekkers A., Li J., Yu X.H., Almassy R.J., Kumpf R.A., Boritzki T.J., Zhang C., Calabrese C.R., Curtin N.J., Kyle S., Thomas H.D., Wang L.Z., Calvert A.H., Golding B.T., Griffin R.J., Newell D.R. Design, synthesis, and evaluation of 3,4-dihydro-2H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-1-ones as inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // J. Med. Chem. 2004. V. 47. № 22. P. 5467-5481.
- 73. Webber S.E., Canan-Koch S.S., Tikhe J., Thoresen L.H. Tricyclic inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerases // US patent № 6495541 B1. 2002.
- 74. Robillard L., Nguyen, M., Harding, T.C., Simmons, A.D In vitro and in vivo assessment of the mechanism of action of the PARP inhibitor rucaparib (abstract) // Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. - 2017. - V. 77. - Abstract № 2475.

- 75. Thorsell A.G., Ekblad T., Karlberg T., Low M., Pinto A.F., Tresaugues L., Moche M., Cohen M.S., Schuler H. Structural basis for potency and promiscuity in poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) and tankyrase Inhibitors // J. Med. Chem. - 2017. - V. 60. - № 4. - P. 1262-1271.
- 76. Liu J.F., Konstantinopoulos P.A., Matulonis U.A. PARP inhibitors in ovarian cancer: current status and future promise // Gynecol. Oncol. 2014. V. 133.
 № 2. P. 362-369.
- Plummer R., Lorigan P., Steven N., Scott L., Middleton M.R., Wilson R.H., Mulligan E., Curtin N., Wang D., Dewji R., Abbattista A., Gallo J., Calvert H. A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotentiation // Cancer Chemother. Pharmacol. 2013. V. 71. № 5. P. 1191-1199.
- Falzacappa M.V., Ronchini C., Faretta M., Iacobucci I., Di Rora A.G., Martinelli G., Meyer L.H., Debatin K.M., Orecchioni S., Bertolini F., Pelicci P.G. The combination of the PARP inhibitor Rucaparib and 5FU is an effective strategy for treating acute leukemias // Mol. Cancer Ther. - 2015. -V. 14. - № 4. - P. 889-898.
- 79. Dockery L.E., Gunderson C.C., Moore K.N. Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer // Onco Targets Ther. - 2017. - V. 10. - P. 3029-3037.
- 80. Wang B., Chu D. Methods of using dihydropyridophthalazinone inhibitors of poly (adp-ribose)polymerase (parp) // Patent № WO2011130661 A1. 2011.
- Murai J., Huang S.Y., Renaud A., Zhang Y., Ji J., Takeda S., Morris J., Teicher B., Doroshow J.H., Pommier Y. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib // Mol. Cancer Ther. 2014. V. 13. № 2. P. 433-443.
- Hopkins T.A., Shi Y., Rodriguez L.E., Solomon L.R., Donawho C.K., DiGiammarino E.L., Panchal S.C., Wilsbacher J.L., Gao W., Olson A.M., Stolarik D.F., Osterling D.J., Johnson E.F., Maag D. Mechanistic Dissection

of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors // Mol. Cancer Res. - 2015. - V. 13. - № 11. - P. 1465-1477.

- 83. Cardnell R.J., Feng Y., Diao L., Fan Y.H., Masrorpour F., Wang J., Shen Y., Mills G.B., Minna J.D., Heymach J.V., Byers L.A. Proteomic markers of DNA repair and PI3K pathway activation predict response to the PARP inhibitor BMN 673 in small cell lung cancer // Clin. Cancer Res. 2013. V. 19. № 22. P. 6322-6328.
- 84. Shen Y., Aoyagi-Scharber M., Wang B. Trapping poly(ADP-Ribose) polymerase // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. V. 353. № 3. P. 446-457.
- 85. Pommier Y., O'Connor M.J., de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells:
 PARP inhibitors and their mechanisms of action // Sci. Transl. Med. 2016. V. 8. № 362. P. 362ps317.
- 86. Shen Y., Rehman F.L., Feng Y., Boshuizen J., Bajrami I., Elliott R., Wang B., Lord C.J., Post L.E., Ashworth A. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency // Clin. Cancer Res. - 2013. - V. 19. - № 18. - P. 5003-5015.
- Vaghefi M. Nucleoside Triphosphates and their Analogs: Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications // Taylor & Francis. - 2005.
- 88. Hoyle C.H.V., Hilderman R.H., Pintor J.J., Schluter H., King B.F. Diadenosine polyphosphates as extracellular signal molecules // Drug Dev. Res. 2001. V. 52. № 1-2. P. 260-273.
- 89. McLennan A.G. Dinucleoside polyphosphates friend or foe? // Pharm. Therap. - 2000. - V. 87. - № 2-3. - P. 73-89.
- 90. Schluter H., Offers E., Bruggemann G., Vandergiet M., Tepel M., Nordhoff E., Karas M., Spieker C., Witzel H., Zidek W. Diadenosine Phosphates and the Physiological Control of Blood-Pressure // Nature. 1994. V. 367. № 6459. P. 186-188.
- 91. Verspohl E.J., Blackburn G.M., Hohmeier N., Hagemann J., Lempka M. Synthetic, nondegradable diadenosine polyphosphates and diinosine

polyphosphates: Their effects on insulin-secreting cells and cultured vascular smooth muscle cells // J. Med. Chem. - 2003. - V. 46. - № 8. - P. 1554-1562.

- 92. Palfi Z., Suranyi G., Borbely G. Alterations in the Accumulation of Adenylylated Nucleotides in Heavy-Metal-Ion-Stressed and Heat-Stressed Synechococcus Sp Strain Pcc-6301, a Cyanobacterium, in Light and Dark // Biochem. J. - 1991. - V. 276. - P. 487-491.
- 93. Chan S.W., Gallo S.J., Kim B.K., Guo M.J., Blackburn G.M., Zamecnik P.C. P-1,P-4-Dithio-P-2,P-3-monochloromethylene diadenosine 5',5'"-P-1,P-4-tetraphosphate: A novel antiplatelet agent // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 8. P. 4034-4039.
- 94. Pintor J., Diaz-Hernandez M., Gualix J., Gomez-Villafuertes R., Hernando F., Miras-Portugal M.T. Diadenosine polyphosphate receptors from rat and guinea-pig brain to human nervous system // Pharm. Therap. 2000. V. 87.
 № 2-3. P. 103-115.
- 95. Walkowiak B., Baraniak J., Cierniewski C.S., Stec W. Inhibition of ADP-triggered blood platelet aggregation by diadenosine polyphosphate analogues
 // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. V. 12. № 15. P. 1959-1962.
- 96. Pendergast W., Yerxa B.R., Douglass Iii J.G., Shaver S.R., Dougherty R.W., Redick C.C., Sims I.F., Rideout J.L. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. - 2001. - V. 11. - № 2. - P. 157-160.
- 97. Shirokova E.A., Khandazhinskaya A.L., Skoblov Y.S., Goryunova L.Y., Beabealashvilli R.S., Krayevsky A.A. Modified dinucleoside tetraphosphonates, new potential inhibitors of HIV reverse transcriptase // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 4-7. P. 1033-1036.
- 98. Douglass J.G., Patel R.I., Yerxa B.R., Shaver S.R., Watson P.S., Bednarski K., Plourde R., Redick C.C., Brubaker K., Jones A.C., Boyer J.L. Lipophilic modifications to dinucleoside polyphosphates and nucleotides that confer

antagonist properties at the platelet P2Y(12) receptor // J. Med. Chem. - 2008. - V. 51. - № 4. - P. 1007-1025.

- 99. Guzman-Aranguez A., Diez L.M., Martin-Gil A., Gualix J., Miras-Portugal M.T., Pintor J. Effect of diinosine polyphosphates on intraocular pressure in normotensive rabbits // Exp. Eye Res. - 2012. - V. 101. - P. 49-55.
- 100. Matsumoto T., Goulopoulou S., Taguchi K., Tostes R.C., Kobayashi T. Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes // Br. J. Pharmacol. - 2015. - V. 172. - № 16. - P. 3980-4001.
- 101. Zdanowicz A., Thermann R., Kowalska J., Jemielity J., Duncan K., Preiss T., Darzynkiewicz E., Hentze M.W. Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression // Mol. Cell. 2009. V. 35. № 6. P. 881-888.
- 102. Bonnac L., Chen L., Pathak R., Gao G., Ming Q., Bennett E., Felczak K., Kullberg M., Patterson S.E., Mazzola F., Magni G., Pankiewicz K.W. Probing binding requirements of NAD kinase with modified substrate (NAD) analogues // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2007. - V. 17. - № 6. - P. 1512-1515.
- 103. Chen L., Gao G., Felczak K., Bonnac L., Patterson S.E., Wilson D., Bennett E.M., Jayaram H.N., Hedstrom L., Pankiewicz K.W. Probing binding requirements of type I and type II isoforms of inosine monophosphate dehydrogenase with adenine-modified nicotinamide adenine dinucleotide analogues // J. Med. Chem. 2007. V. 50. № 23. P. 5743-5751.
- 104. Ji D.B., Wang L., Liu W.J., Hou S.H., ZongBao Z.K. Synthesis of NAD analogs to develop bioorthogonal redox system // Sci. China Chem. 2013. V. 56. № 3. P. 296-300.
- 105. Ji D., Wang L., Hou S., Liu W., Wang J., Wang Q., Zhao Z.K. Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide // J. Am. Chem. Soc. - 2011. - V. 133. - № 51. - P. 20857-20862.
- 106. Dutta A.K., Captain I., Jessen H.J. New Synthetic Methods for Phosphate Labeling // Top. Curr. Chem. - 2017. - V. 375. - № 3. - P. 51.

- 107. Depaix A., Peyrottes S., Roy B. One-Pot Synthesis of Nucleotides and Conjugates in Aqueous Medium // Eur. J. Org. Chem. - 2017. - V. 2017. - № 2. - P. 241-245.
- 108. Shanmugasundaram M., Senthilvelan A., Xiao Z., Kore A.R. An Efficient Protection-Free One-Pot Chemical Synthesis of Modified Nucleoside-5'-Triphosphates // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. - 2016. - V. 35. - № 7. - P. 356-362.
- 109. Roy B., Depaix A., Perigaud C., Peyrottes S. Recent trends in nucleotide synthesis // Chem. Rev. 2016. V. 116. № 14. P. 7854-7897.
- 110. Hofer A., Marques E., Kieliger N., Gatter S.K., Jordi S., Ferrari E., Hofmann M., Fitzpatrick T.B., Hottiger M.O., Jessen H.J. Chemoselective dimerization of phosphates // Org. Lett. 2016. V. 18. № 13. P. 3222-3225.
- 111. Xu Z.H. A review on the chemical synthesis of pyrophosphate bonds in bioactive nucleoside diphosphate analogs // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015.
 V. 25. № 18. P. 3777-3783.
- Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides // Tetrahedron Lett. - 1967. - V. 50. - P. 5065-5068.
- 113. Ikemoto T., Haze A., Hatano H., Kitamoto Y., Ishida M., Nara K. Phosphorylation of nucleosides with phosphorus oxychloride in trialkyl phosphate // Chem. Pharm. Bull. 1995. V. 43. № 2. P. 210-215.
- 114. Ludwig J. A new route to nucleoside 5'-triphosphates // Acta Biochim.
 Biophys. Acad. Sci. Hung. 1981. V. 16. № 3-4. P. 131-133.
- 115. Ruth J.L., Cheng Y.C. Nucleoside analogues with clinical potential in antivirus chemotherapy. The effect of several thymidine and 2'-deoxycytidine analogue 5'-triphosphates on purified human (alpha, beta) and herpes simplex virus (types 1, 2) DNA polymerases // Mol. Pharmacol. 1981. V. 20. № 2. P. 415-422.

- 116. Kore A.R., Senthilvelan A., Srinivasan B., Shanmugasundaram M. Facile protection-free one-pot chemical synthesis of nucleoside-5'-tetraphosphates // Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids. - 2013. - V. 32. - № 8. - P. 411-420.
- 117. Ko H., Carter R.L., Cosyn L., Petrelli R., de Castro S., Besada P., Zhou Y., Cappellacci L., Franchetti P., Grifantini M., Van Calenbergh S., Harden T.K., Jacobson K.A. Synthesis and potency of novel uracil nucleotides and derivatives as P2Y2 and P2Y6 receptor agonists // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. № 12. P. 6319-6332.
- 118. Maruoka H., Jayasekara M.P., Barrett M.O., Franklin D.A., de Castro S., Kim N., Costanzi S., Harden T.K., Jacobson K.A. Pyrimidine nucleotides with 4-alkyloxyimino and terminal tetraphosphate delta-ester modifications as selective agonists of the P2Y(4) receptor // J. Med. Chem. 2011. V. 54. № 12. P. 4018-4033.
- 119. Abramova T.V., Bakharev P.A., Vasilyeva S.V., Silnikov V.N. Synthesis of morpholine nucleoside triphosphates // Tetrahedron Lett. 2004. V. 45. № 22. P. 4361-4364.
- 120. Abramova T.V., Vasileva S.V., Koroleva L.S., Kasatkina N.S., Silnikov V.N. Design and synthesis of dinucleotide 5'-triphosphates with expanded functionality // Bioorg. Med. Chem. - 2008. - V. 16. - № 20. - P. 9127-9132.
- 121. Ludwig J., Eckstein F. Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one // J. Org. Chem. 1989. V. 54. № 3. P. 631-635.
- Horhota A., Zou K., Ichida J.K., Yu B., McLaughlin L.W., Szostak J.W., Chaput J.C. Kinetic analysis of an efficient DNA-dependent TNA polymerase
 // J. Am. Chem. Soc. - 2005. - V. 127. - № 20. - P. 7427-7434.
- 123. Hirao I., Mitsui T., Kimoto M., Yokoyama S. An efficient unnatural base pair for PCR amplification // J. Am. Chem. Soc. - 2007. - V. 129. - № 50. - P. 15549-15555.

- 124. Yang Z., Sismour A.M., Sheng P., Puskar N.L., Benner S.A. Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35.
 № 13. P. 4238-4249.
- 125. Johannsen M.W., Veedu R.N., Madsen A.S., Wengel J. Enzymatic polymerisation involving 2'-amino-LNA nucleotides // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2012. - V. 22. - № 10. - P. 3522-3526.
- 126. Hollenstein M. Synthesis of deoxynucleoside triphosphates that include proline, urea, or sulfonamide groups and their polymerase incorporation into DNA // Chem. Eur. J. - 2012. - V. 18. - № 42. - P. 13320-13330.
- 127. Hollenstein M., Wojciechowski F., Leumann C.J. Polymerase incorporation of pyrene-nucleoside triphosphates // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. V. 22. № 13. P. 4428-4430.
- 128. Veedu R.N., Burri H.V., Kumar P., Sharma P.K., Hrdlicka P.J., Vester B., Wengel J. Polymerase-directed synthesis of C5-ethynyl locked nucleic acids
 // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2010. - V. 20. - № 22. - P. 6565-6568.
- 129. Lebedev A.V., Koukhareva, II, Beck T., Vaghefi M.M. Preparation of oligodeoxynucleotide 5'-triphosphates using solid support approach // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. - 2001. - V. 20. - № 4-7. - P. 1403-1409.
- Goldeck M., Tuschl T., Hartmann G., Ludwig J. Efficient solid-phase synthesis of pppRNA by using product-specific labeling // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. V. 53. № 18. P. 4694-4698.
- 131. Caton-Williams J., Lin L., Smith M., Huang Z. Convenient synthesis of nucleoside 5'-triphosphates for RNA transcription // Chem. Commun. 2011.
 V. 47. № 28. P. 8142-8144.
- 132. Wendicke S., Warnecke S., Meier C. Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2008. V. 47. № 8. P. 1500-1502.

- 133. Warnecke S., Meier C. Synthesis of nucleoside di- and triphosphates and dinucleoside polyphosphates with cycloSal-nucleotides // J. Org. Chem. 2009. V. 74. № 8. P. 3024-3030.
- 134. Sun Q., Edathil J.P., Wu R., Smidansky E.D., Cameron C.E., Peterson B.R. One-pot synthesis of nucleoside 5'-triphosphates from nucleoside 5'-Hphosphonates // Org. Lett. - 2008. - V. 10. - № 9. - P. 1703-1706.
- 135. Sun Q., Gong S., Sun J., Liu S., Xiao Q., Pu S. A P(V)–N activation strategy for the synthesis of nucleoside polyphosphates // J. Org. Chem. 2013. V. 78. № 17. P. 8417-8426.
- 136. Zlatev I., Lackey J.G., Zhang L., Dell A., McRae K., Shaikh S., Duncan R.G., Rajeev K.G., Manoharan M. Automated parallel synthesis of 5'-triphosphate oligonucleotides and preparation of chemically modified 5'-triphosphate small interfering RNA // Bioorg. Med. Chem. - 2013. - V. 21. - № 3. - P. 722-732.
- 137. Zlatev I., Lavergne T., Debart F., Vasseur J.J., Manoharan M., Morvan F. Efficient solid-phase chemical synthesis of 5'-triphosphates of DNA, RNA, and their analogues // Org. Lett. 2010. V. 12. № 10. P. 2190-2193.
- 138. Johnson D.C., 2nd, Widlanski T.S. Overview of the synthesis of nucleoside phosphates and polyphosphates // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. - 2004. -V. Chapter 13. - P. 13.1.1-13.1.31.
- 139. Chu B.C., Orgel L.E. Preparation of ligation intermediates and related polynucleotide pyrophosphates // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 782. No 1. P. 103-105.
- 140. Shimazu M., Shinozuka K., Sawai H. Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by Mn(II) and Cd(II) ion-catalyzed pyrophosphate bond formation in aqueous solution // Tetrahedron Lett. - 1990. - V. 31. - № 2. - P. 235-238.
- 141. Pendergast W., Yerxa B.R., Douglass J.G., Shaver S.R., Dougherty R.W., Redick C.C., Sims I.F., Rideout J.L. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5 '-polyphosphates // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2001. - V. 11. - № 2. - P. 157-160.

- 142. Eliahu S., Barr H.M., Camden J., Weisman G.A., Fischer B. A novel insulin secretagogue based on a dinucleoside polyphosphate scaffold(1) // J. Med. Chem. 2010. V. 53. № 6. P. 2472-2481.
- 143. Hofer K., Abele F., Schlotthauer J., Jaschke A. Synthesis of 5'-NAD-capped RNA // Bioconjug. Chem. - 2016. - V. 27. - № 4. - P. 874-877.
- 144. Lohrmann R., Orgel L.E. Preferential formation of (2'-5')-linked internucleotide bonds in non-enzymatic reactions // Tetrahedron. 1978. V. 34. № 7. P. 853-855.
- 145. Zhang B., Wagner G.K., Weber K., Garnham C., Morgan A.J., Galione A., Guse A.H., Potter B.V. 2'-Deoxy cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose derivatives: importance of the 2'-hydroxyl motif for the antagonistic activity of 8-substituted cADPR derivatives // J. Med. Chem. 2008. V. 51. № 6. P. 1623-1636.
- 146. Ansiaux C., N'Go I., Vincent S.P. Reversible and efficient inhibition of UDPgalactopyranose mutase by electrophilic, constrained and unsaturated UDPgalactitol analogues // Chem. Eur. J. - 2012. - V. 18. - № 46. - P. 14860-14866.
- 147. Mukaiyama T. An application of organic phosphorus compounds in the peptide and nucleotide synthesis // Phosphorus Sulfur Relat. Elem. 1976. V. 1. № 2-3. P. 371-387.
- 148. Mukaiyama T. Oxidation-reduction condensation // Angew. Chem. Int. Ed.
 Engl. 1976. V. 15. № 2. P. 94-103.
- 149. Мишенина Г.Ф., Сумаков, В. В., Шубина, Т. Н. Селективная модификация монозамещенных фосфатных групп в 5'-моно- и полифосфатных нуклеозидов и олигонуклеотидов // Биоорган. химия. -1979. - V. 5. - № 6. - Р. 886-894.
- 150. Knorre D.G., Alekseyev P.V., Gerassimova Y.V., Silnikov V.N., Maksakova G.A., Godovikova T.S. Intraduplex photo-cross-linking of p-azidoaniline residue and amino acid side chains linked to the complementary oligonucleotides via a new phosphorylating intermediate formed in the

Mukaiyama system // Nucleosides Nucleotides. - 1998. - V. 17. - № 1-3. - P. 397-410.

- 151. Tanaka H., Yoshimura Y., Jorgensen M.R., Cuesta-Seijo J.A., Hindsgaul O. A simple synthesis of sugar nucleoside diphosphates by chemical coupling in water // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. V. 51. № 46. P. 11531-11534.
- 152. Sawai H., Wakai H., Shimazu M. Facile synthesis of cap portion of messenger RNA by Mn(II) ion-catalyzed pyrophosphate formation in aqueous solution // Tetrahedron Lett. - 1991. - V. 32. - № 47. - P. 6905-6906.
- 153. Ng K.E., Orgel L.E. The action of a water-soluble carbodiimide on adenosine-5'-polyphosphates // Nucleic Acids Res. - 1987. - V. 15. - № 8. - P. 3573-3580.
- 154. Kadokura M., Wada T., Urashima C., Sekine M. Efficient synthesis of γmethyl-capped guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolidate using ZnCl₂ as a catalyst in DMF under anhydrous conditions // Tetrahedron Lett. - 1997. - V. 38. - № 48. - P. 8359-8362.
- 155. Jemielity J., Stepinski J., Jaremko M., Haber D., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. Synthesis of novel mRNA 5' cap-analogues: dinucleoside P1, P3-tri-, P1, P4-tetra-, and P1, P5-pentaphosphates // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. - 2003. - V. 22. - № 5-8. - P. 691-694.
- 156. Shaver S., Rideout J., Pendergast W., Douglass J., Brown E., Boyer J., Patel R., Redick C., Jones A., Picher M., Yerxa B. Structure–activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors // Purinergic Signalling. 2005. V. 1. № 2. P. 183-191.
- 157. Nahum V., Tulapurkar M., Lévesque S.A., Sévigny J., Reiser G., Fischer B. Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y1 and P2Y2 receptors // J. Med. Chem. 2006. V. 49. № 6. P. 1980-1990.

- 158. Jemielity J., Fowler T., Zuberek J., Stepinski J., Lewdorowicz M., Niedzwiecka A., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. Novel "antireverse" cap analogs with superior translational properties // RNA. - 2003. -V. 9. - № 9. - P. 1108-1122.
- Piecyk K., Davis R.E., Jankowska-Anyszka M. 5'-Terminal chemical capping of spliced leader RNAs // Tetrahedron Lett. - 2012. - V. 53. - № 36. - P. 4843-4847.
- 160. Sood A., Kumar S., Nampalli S., Nelson J.R., Macklin J., Fuller C.W. Terminal phosphate-labeled nucleotides with improved substrate properties for homogeneous nucleic acid assays // J. Am. Chem. Soc. - 2005. - V. 127. -№ 8. - P. 2394-2395.
- 161. Korlach J., Bibillo A., Wegener J., Peluso P., Pham T.T., Park I., Clark S., Otto G.A., Turner S.W. Long, Processive enzymatic DNA synthesis using 100 % dye-labeled terminal phosphate-linked nucleotides // Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids. 2008. V. 27. № 9. P. 1072-1082.
- 162. Strenkowska M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Zuberek J., Su W., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Jemielity J. Towards mRNA with superior translational activity: synthesis and properties of ARCA tetraphosphates with single phosphorothioate modifications // New J. Chem. 2010. V. 34. № 5. P. 993-1007.
- 163. Jemielity J., Kowalska J., Rydzik A.M., Darzynkiewicz E. Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge synthesis, applications and prospects // New J. Chem. 2010. V. 34. № 5. P. 829-844.
- 164. Jankowska-Anyszka M., Piecyk K. Dinucleotide cap analogue affinity resins for purification of proteins that specifically recognize the 5' end of mRNA // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. № 20. P. 6131-6134.
- 165. Jankowska-Anyszka M., Piecyk K., Samonina-Kosicka J. Synthesis of a new class of ribose functionalized dinucleotide cap analogues for biophysical studies on interaction of cap-binding proteins with the 5[prime or minute] end of mRNA // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. № 15. P. 5564-5572.

- 166. Rydzik A.M., Kulis M., Lukaszewicz M., Kowalska J., Zuberek J., Darzynkiewicz Z.M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety—fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis // Bioorg. Med. Chem. - 2012. - V. 20. - № 5. - P. 1699-1710.
- 167. Kowalska J., Wypijewska del Nogal A., Darzynkiewicz Z.M., Buck J., Nicola C., Kuhn A.N., Lukaszewicz M., Zuberek J., Strenkowska M., Ziemniak M., Maciejczyk M., Bojarska E., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Sahin U., Jemielity J. Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. № 16. P. 10245-10264.
- 168. Zytek M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Wojtczak B.A., Zuberek J., Ferenc-Mrozek A., Darzynkiewicz E., Niedzwiecka A., Jemielity J. Towards novel efficient and stable nuclear import signals: synthesis and properties of trimethylguanosine cap analogs modified within the 5',5'-triphosphate bridge // Org. Biomol. Chem. - 2014. - V. 12. - № 45. - P. 9184-9199.
- 169. Kore A.R., Bugarin A., Shanmugasundaram M. Design and facile synthesis of new dinucleotide cap analog containing both 2' and 3'-OH modification on m(7)guanosine moiety // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2015. V. 34. № 9. P. 611-619.
- 170. Strenkowska M., Grzela R., Majewski M., Wnek K., Kowalska J., Lukaszewicz M., Zuberek J., Darzynkiewicz E., Kuhn A.N., Sahin U., Jemielity J. Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential // Nucleic Acids Res. - 2016. - V. 44. - № 20. - P. 9578-9590.
- 171. Yanachkov I.B., Dix E.J., Yanachkova M.I., Wright G.E. P 1,P2-Diimidazolyl derivatives of pyrophosphate and bis-phosphonates synthesis, properties, and use in preparation of dinucleoside tetraphosphates and analogs // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. № 3. P. 730-738.

- 172. Yanachkov I.B., Chang H., Yanachkova M.I., Dix E.J., Berny-Lang M.A., Gremmel T., Michelson A.D., Wright G.E., Frelinger A.L., 3rd New highly active antiplatelet agents with dual specificity for platelet P2Y1 and P2Y12 adenosine diphosphate receptors // Eur. J. Med. Chem. - 2016. - V. 107. - P. 204-218.
- 173. Kozlov M., Bergendahl V., Burgess R., Goldfarb A., Mustaev A. Homogeneous fluorescent assay for RNA polymerase // Anal. Biochem. 2005. V. 342. № 2. P. 206-213.
- 174. Abramova T.V., Vasileva S.V., Serpokrylova I.Y., Kless H., Silnikov V.N. A facile and effective synthesis of dinucleotide 5'-triphosphates // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. № 20. P. 6549-6555.
- 175. Marlow A.L., Kiessling L.L. Improved chemical synthesis of UDPgalactofuranose // Org. Lett. - 2001. - V. 3. - № 16. - P. 2517-2519.
- 176. Dykhuizen E.C., Kiessling L.L. Potent Ligands for Prokaryotic UDPgalactopyranose mutase that exploit an enzyme subsite // Org. Lett. - 2009. -V. 11. - № 1. - P. 193-196.
- Hou S.H., Liu W.J., Ji D.B., Wang Q., Zhao Z.K. Synthesis of 1,2,3-triazole moiety-containing NAD analogs and their potential as redox cofactors // Tetrahedron Lett. 2011. V. 52. № 44. P. 5855-5857.
- 178. Ji D., Wang L., Hou S., Liu W., Wang J., Wang Q., Zhao Z.K. Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide // J. Am. Chem. Soc. - 2011. - V. 133. - № 51. - P. 20857-20862.
- 179. Mohamady S., Taylor S.D. General procedure for the synthesis of dinucleoside polyphosphates // J. Org. Chem. - 2011. - V. 76. - № 15. - P. 6344-6349.
- 180. Mohamady S., Desoky A., Taylor S.D. Sulfonyl imidazolium salts as reagents for the rapid and efficient synthesis of nucleoside polyphosphates and their conjugates // Org. Lett. - 2012. - V. 14. - № 1. - P. 402-405.

- 181. Mohamady S., Taylor S.D. Synthesis of nucleoside tetraphosphates and dinucleoside pentaphosphates via activation of cyclic trimetaphosphate // Org. Lett. - 2013. - V. 15. - № 11. - P. 2612-2615.
- 182. Smithen D.A., Forget S.M., McCormick N.E., Syvitski R.T., Jakeman D.L. Polyphosphate-containing bisubstrate analogues as inhibitors of a bacterial cell wall thymidylyltransferase // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. № 11. P. 3347-3350.
- 183. Yanachkov I., Pan J.Y., WesslingResnick M., Wright G.E. Synthesis and effect of nonhydrolyzable xanthosine triphosphate derivatives on prenylation of Rab5(D136N) // Mol. Pharmacol. - 1997. - V. 51. - № 1. - P. 47-51.
- 184. Kanavarioti A., Lu J., Rosenbach M.T., Brian Hurley T. Unexpectedly facile synthesis of symmetrical P1,P2-dinucleoside-5'pyrophosphates // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 43. P. 6065-6068.
- 185. Bogachev V.S. Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphates using trifluoroacetic anhydride as an activating reagent // Rus. J. Bioorg. Chem. -1996. - V. 22. - № 9. - P. 699-705.
- 186. Risbood P.A., Kane C.T., Jr., Hossain M.T., Vadapalli S., Chadda S.K. Synthesis of gemcitabine triphosphate (dFdCTP) as a tris(triethylammonium) salt // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2008. - V. 18. - № 9. - P. 2957-2958.
- 187. Timmons S.C., Jakeman D.L. Stereospecific synthesis of sugar-1-phosphates and their conversion to sugar nucleotides // Carbohydr. Res. 2008. V. 343.
 № 5. P. 865-874.
- 188. Dorfmueller H.C., Borodkin V.S., Blair D.E., Pathak S., Navratilova I., van Aalten D.M. Substrate and product analogues as human O-GlcNAc transferase inhibitors // Amino Acids. - 2011. - V. 40. - № 3. - P. 781-792.
- 189. Forget S.M., Smithen D.A., Jee A., Jakeman D.L. Mechanistic evaluation of a nucleoside tetraphosphate with a thymidylyltransferase // Biochemistry. 2015. V. 54. № 8. P. 1703-1707.
- 190. Moffatt J.G., Khorana H.G. Nucleoside polyphosphates. X.1 The synthesis and some reactions of nucleoside-5' phosphoromorpholidates and related

compounds. improved methods for the preparation of nucleoside-5' polyphosphates // J. Am. Chem. Soc. - 1961. - V. 83. - № 3. - P. 649-658.

- 191. Hall H.K. Correlation of the base strengths of amines // J. Am. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 20. P. 5441-5444.
- 192. Мишенина Г.Ф., Сумаков, В. В., Шубина, Т. Н. Синтез 5'-трифосфатов дезоксиолигонуклеотидов и их превоащение в γ-амиды // Биоорган. химия. 1976. V. 2. № 2. Р. 179-188.
- 193. Imai J., Torrence P.F. Expedient chemical synthesis of sequence-specific 2',5'oligonucleotides // J. Org. Chem. - 1985. - V. 50. - № 9. - P. 1418-1426.
- 194. Prabahar K.J., Cole T.D., Ferris J.P. Effect of phosphate activating group on oligonucleotide formation on montmorillonite: the regioselective formation of 3',5'-linked oligoadenylates // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. № 24. P. 10914-10920.
- 195. Pergolizzi G., Butt J.N., Bowater R.P., Wagner G.K. A novel fluorescent probe for NAD-consuming enzymes // Chem. Commun. 2011. V. 47. № 47. P. 12655-12657.
- 196. Sun Q., Gong S., Sun J., Wang C., Liu S., Liu G., Ma C. Efficient synthesis of nucleoside 5'-triphosphates and their β,γ-bridging oxygen-modified analogs from nucleoside 5'-phosphates // Tetrahedron Lett. 2014. V. 55. Nº 13. P. 2114-2118.
- 197. Moffatt J.G. A general synthesis of nucleosides-5' triphosphates // Can. J. Chem. 1964. V. 42. № 3. P. 599-604.
- 198. Reiss J.R., Moffatt J.G. Dismutation reactions of nucleoside polyphosphates.
 III. The synthesis of α,ι-dinucleoside 5'-polyphosphates // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 10. P. 3381-3387.
- 199. Miyashita T., Sakata S., Hayakawa H. First synthesis of enantio-uracil dinucleotide, comparison of physicochemical properties of their enantiomers, and separation by chiral column chromatography // Tetrahedron Lett. 2003.
 V. 44. № 47. P. 8605-8607.

- 200. Moffatt J.G. [15] Sugar nucleotide synthesis by the phosphoromorpholidate procedure // Methods in Enzymology. 1966. V. 8. № P. 136-142.
- 201. Hamilton C.J., Roberts S.M., Shipitsin A. Synthesis of a potent inhibitor of HIV reverse transcriptase // Chem. Commun. 1998. № 10. P. 1087-1088.
- 202. Nunez H.A., O'Connor J.V., Rosevear P.R., Barker R. The synthesis and characterization of α- and (β-L-fucopyranosyl phosphates and GDP fucose // Can. J. Chem. - 1981. - V. 59. - № 14. - P. 2086-2095.
- 203. Gokhale U.B., Hindsgaul O., Palcic M.M. Chemical synthesis of GDP-fucose analogs and their utilization by the Lewis *A(1→4) fucosyltransferase // Can.
 J. Chem. 1990. V. 68. № 7. P. 1063-1071.
- 204. Schmidt R.R., Wegmann B., Jung K.-H. Glycosyl imidates, 47. Stereospecific synthesis of α- and β-L-fucopyranosyl phosphates and of gdp-fucose via trichloroacetimidate // Liebigs Annalen der Chemie. 1991. V. 1991. № 2. P. 121-124.
- 205. Ichikawa Y., Sim M.M., Wong C.H. Efficient chemical synthesis of GDPfucose // J. Org. Chem. - 1992. - V. 57. - № 10. - P. 2943-2946.
- 206. Adelhorst K., Whitesides G.M. Large-scale synthesis of beta-L-fucopyranosyl phosphate and the preparation of GDP-beta-L-fucose // Carbohydr. Res. -1993. - V. 242. - P. 69-76.
- 207. Wittmann V., Wong C.-H. 1H-Tetrazole as catalyst in phosphomorpholidate coupling reactions: efficient synthesis of GDP-fucose, GDP-mannose, and UDP-galactose // J. Org. Chem. 1997. V. 62. № 7. P. 2144-2147.
- 208. Martinez Farias M.A., Kincaid V.A., Annamalai V.R., Kiessling L.L. Isoprenoid phosphonophosphates as glycosyltransferase acceptor substrates // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. № 24. P. 8492-8495.
- 209. Li X.J., Gong S.S., Sun Q. A Novel Synthesis of acyclovir polyphosphates via acyclovir phosphoropiperidate intermediate // Mat. Sci. Env. Prot. Appl. Res. 2014. V. 908. P. 203-206.

- 210. Sun Q., Gong S.S., Liu S., Sun J., Liu G.D., Ma C. 4,5-Dicyanoimidazole-promoted synthesis of dinucleoside polyphosphates and their analogs // Tetrahedron. 2014. V. 70. № 30. P. 4500-4506.
- 211. Sun Q., Sun J., Gong S.S., Wang C.J., Wang X.C. One-pot synthesis of symmetrical dinucleoside polyphosphates and analogs via 4,5dicyanoimidazole-promoted tandem P-O coupling reactions // Tetrahedron Lett. - 2014. - V. 55. - № 42. - P. 5785-5788.
- 212. Xie Z.B., Gong S.S., Sun Q. Preparation of adenosine-containing artificial dinucleoside triphosphates // Mechan. Engin. Mat. Inf. Techn. II. 2014. V. 662. № P. 71-74.
- 213. Ravalico F., Messina I., Berberian M.V., James S.L., Migaud M.E., Vyle J.S. Rapid synthesis of nucleotide pyrophosphate linkages in a ball mill // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. № 19. P. 6496-6497.
- 214. Caruthers M.H. Chemical synthesis of DNA and DNA analogs // Acc. Chem.
 Res. 1991. V. 24. № 9. P. 278-284.
- 215. Ahmadibeni Y., Parang K. Solid-Phase Synthesis of symmetrical 5',5'dinucleoside mono-, di-, tri-, and tetraphosphodiesters // Org. Lett. - 2007. -V. 9. - № 22. - P. 4483-4486.
- 216. Gold H., van Delft P., Meeuwenoord N., Codee J.D., Filippov D.V., Eggink G., Overkleeft H.S., van der Marel G.A. Synthesis of sugar nucleotides by application of phosphoramidites // J. Org. Chem. 2008. V. 73. № 23. P. 9458-9460.
- 217. Cremosnik G.S., Hofer A., Jessen H.J. Iterative synthesis of nucleoside oligophosphates with phosphoramidites // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. V. 53. № 1. P. 286-289.
- 218. Jessen H.J., Ahmed N., Hofer A. Phosphate esters and anhydrides--recent strategies targeting nature's favoured modifications // Org. Biomol. Chem. 2014. V. 12. № 22. P. 3526-3530.

- 219. Khorana H.G. Carbodiimides. Part V.1 A Novel synthesis of adenosine diand triphosphate and P1,P2-diadenosine-5'-pyrophosphate // J. Am. Chem. Soc. - 1954. - V. 76. - № 13. - P. 3517-3522.
- 220. Hacker S.M., Mex M., Marx A. Synthesis and stability of phosphate modified ATP analogues // J. Org. Chem. 2012. V. 77. № 22. P. 10450-10454.
- 221. Blackburn G.M., Taylor G.E., Thatcher G.R., Prescott M., McLennan A.G. Synthesis and resistance to enzymic hydrolysis of stereochemically-defined phosphonate and thiophosphate analogues of P1,P4-bis(5'-adenosyl) tetraphosphate // Nucleic Acids Res. - 1987. - V. 15. - № 17. - P. 6991-7004.
- 222. Pankiewicz K.W., Lesiak K., Zatorski A., Goldstein B.M., Carr S.F., Sochacki M., Majumdar A., Seidman M., Watanabe K.A. The practical synthesis of a methylenebisphosphonate analogue of benzamide adenine dinucleotide: inhibition of human inosine monophosphate dehydrogenase (type I and II) // J. Med. Chem. 1997. V. 40. № 8. P. 1287-1291.
- 223. Banasik M., Ueda K. Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions
 // Mol. Cell Biochem. 1994. V. 138. № 1-2. P. 185-197.
- 224. Blum M., De Robertis E.M., Wallingford J.B., Niehrs C. Morpholinos: antisense and sensibility // Dev. Cell. 2015. V. 35. № 2. P. 145-149.
- 225. Stein C.A. Eteplirsen approved for duchenne muscular dystrophy: the FDA faces a difficult choice // Mol. Ther. 2016. V. 24. № 11. P. 1884-1885.
- 226. Jones S., Smanmoo C. Phosphorylation of Alcohols with N-Phosphoryl Oxazolidinones Employing Copper(II) Triflate Catalysis // Organic Letters. -2005. - V. 7. - № 15. - P. 3271-3274.
- 227. Jones S., Selitsianos D. A Simple and Effective Method for Phosphoryl Transfer Using TiCl4 Catalysis // Organic Letters. - 2002. - V. 4. - № 21. - P. 3671-3673.
- 228. Theodoridis G. Nitrogen Protecting Groups: Recent Developments and New Applications // Tetrahedron. 2000. V. 56. № 16. P. 2339-2358.

- 229. Kong W.B., Zhou X.Y., Yang Y., Xie X.Y. A facile synthesis of ω-aminoalkyl ammonium hydrogen phosphates // Chin. Chem. Lett. 2012. V. 23. № 8.
 P. 923-926.
- 230. Nasopoulou M., Georgiadis D., Matziari M., Dive V., Yiotakis A. A versatile annulation protocol toward novel constrained phosphinic peptidomimetics // J. Org. Chem. 2007. V. 72. № 19. P. 7222-7228.
- 231. Carpino L.A., Han G.Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 19. P. 5748-5749.
- 232. Kore A.R., Yang B., Srinivasan B., Conrad R. Chemical and enzymatic synthesis of nucleoside tetraphosphates // Curr. Org. Chem. 2014. V. 18. Nº 12. P. 1621-1650.
- 233. Debarge S., Balzarini J., Maguire A.R. Design and synthesis of alpha-carboxy phosphononucleosides // J. Org. Chem. 2011. V. 76. № 1. P. 105-126.
- 234. Pattanayak S., Paul S., Nandi B., Sinha S. Improved protocol for the synthesis of flexibly protected morpholino monomers from unprotected ribonucleosides
 // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2012. V. 31. № 11. P. 763-782.
- 235. Summerton J.E., Weller D.D. Uncharged morpholino-based polymers having achiral intersubunit linkages // US Patent № 5034506. 1991.
- 236. Abramova T.V., Kassakin M.F., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Silnikov V.N. New oligonucleotide analogues based on morpholine subunits joined by oxalyl diamide tether // Bioorg. Chem. - 2007. - V. 35. - № 3. - P. 258-275.
- 237. Abramova T.V., Belov S.S., Tarasenko Y.V., Silnikov V.N. Solid-phase-supported synthesis of morpholinoglycine oligonucleotide mimics // Beilstein J. Org. Chem. 2014. V. 10. № P. 1151-1158.
- 238. Staudinger H., Meyer J. Über neue organische phosphorverbindungen III. phosphinmethylenderivate und phosphinimine // Helv. Chim. Acta. 1919. V. 2. № 1. P. 635-646.

- 239. Polushin N.N. The precursor strategy: terminus methoxyoxalamido modifiers for single and multiple functionalization of oligodeoxyribonucleotides // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. № 16. P. 3125-3133.
- 240. Abramova T.V., Silnikov V.N. 4-Aminometyl-3-nitrobenzoic acid--a photocleavable linker for oligonucleotides containing combinatorial libraries // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2005. V. 24. № 9. P. 1333-1343.
- 241. Kupryushkin M.S., Nekrasov M.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers // Org. Lett. - 2014. - V. 16. - № 11. - P. 2842-2845.
- 242. Paul S., Nandi B., Pattanayak S., Sinha S. Synthesis of 5-alkynylated uracil– morpholino monomers using Sonogashira coupling // Tetrahedron Lett. -2012. - V. 53. - № 32. - P. 4179-4183.
- 243. Nandi B., Pattanayak S., Paul S., Sinha S. Synthesis of Nucleobase-Functionalized Morpholino-Modified Nucleoside Monomers Through Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions // Eur. J. Org. Chem. - 2013.
 - V. 2013.- № 7. - P. 1271-1286.
- 244. Chang P.K., Welch A.D. Iodination of 2'-Deoxycytidine and Related Substances1 // J. Med. Chem. 1963. V. 6. № 4. P. 428-430.
- 245. Asakura J., Robins M.J. Cerium(IV)-mediated halogenation at C-5 of uracil derivatives // J. Org. Chem. - 1990. - V. 55. - № 16. - P. 4928-4933.
- 246. Касакин М.Ф., Абрамова, Т. В., Сильников, В. Н. Синтез 2'аминометилморфолиновых аналогов нуклеозидов с 4'карбоксиметильной линкерной группой // Биоорган. химия. - 2011. - V. 37. - № 6. - Р. 830-835.