

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 54.057:577.113.3:57.037:577.151.45

ЦИБУЛЬСКАЯ
ИЛОНА АЛЕКСАНДРОВНА

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОНУКЛЕОТИДОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2016

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Калиниченко Елена Николаевна, член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, зам. директора Института биоорганической химии НАН Беларуси по научной и инновационной работе, начальник НПЦ «Химфармсинтез»

Официальные оппоненты:

Кисель Михаил Александрович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

Книжников Валерий Алексеевич, доктор химических наук, заведующий лабораторией производных аминокислот Института физико-органической химии НАН Беларуси

Оппонирующая организация:

Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

Защита состоится «04» марта 2016 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2 в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. 8 (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «2» февраля 2016 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01

кандидат химических наук

С.В. Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

В терапии онкологических и вирусных заболеваний значительную роль играют препараты на основе нуклеозидов и их модифицированных аналогов. Известно, что применение таких соединений зачастую лимитируется их слабой способностью к транспорту через мембраны, низкой оральной биодоступностью, в связи с которой необходимо использовать высокие дозы препаратов, высокой токсичностью и развитием резистентности при длительном применении.

Описанные явления вызвали большой интерес к синтезу пролекарств, которые могли бы проникать в клетку и выделять активные метаболиты в результате ферментативного или химического гидролиза.

При конструировании пролекарств используется так называемый биомиметический (имитирующий природные процессы) подход. Часто роль транспортной части выполняют вещества липидной природы: жирные кислоты, фосфолипиды и др. Введение фосфолипидного остатка в качестве носителя активного метаболита способствует первичному проникновению препаратов в лимфатическую систему, минуя печень, что позволяет избежать многих недостатков применения.

В связи с вышеизложенным, актуально получение конъюгатов терапевтически значимых нуклеозидов, обладающих противовирусной и противоопухолевой активностью, с 1,2-диацилглицерофосфатами и их 1,3-изомерами и исследование свойств синтезированных производных как депо-форм входящих в их состав нуклеозидов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг. (раздел 2 «Супрамолекулярная химия, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии», пункт 2.2 «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»). Диссертационная работа является частью плановых исследований Лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов Института биоорганической химии НАНБ, выполненных в рамках ГПНИ «Физиологически активные вещества» (2006-2010 гг.), задание 2.04 «Синтез, структура и биологические свойства терапевтически значимых модифицированных нуклеозидов и их депо-форм» (№ ГР 20062213),

ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» (2011-2015 гг.), подпрограмма «Химфармсинтез», задание 2.19 «Разработка методов синтеза биологически значимых пентофурано-фторнуклеозидов D- и L-ряда, их новых структурных аналогов с химиотерапевтическим потенциалом» (№ ГР 20114750), ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» (2011-2015), подпрограмма «Химфармсинтез», задание 4.20 (2014-2015) «Разработка химических и биотехнологических методов синтеза биологически значимых, модифицированных в углеводном фрагменте нуклеозидных аналогов азапиримидинов и производных пуринов, их конъюгатов с фосфолипидами для создания лекарственных препаратов» (№ ГР 20141727).

Цель и задачи исследования

Целью работы является получение конъюгатов терапевтически значимых нуклеозидов с 1,2-диацилглицерофосфатами и их 1,3-изомерами и исследование свойств синтезированных липонуклеотидов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- разработать эффективные схемы синтеза липидных и нуклеозидных структурных блоков;
- разработать методы синтеза фосфолипидных производных нуклеозидов и получить новые 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатные производные ряда нуклеозидов, обладающих противовирусной и противоопухолевой активностью, для их дальнейших биологических исследований;
- изучить способность полученных конъюгатов подвергаться гидролизу ферментами, принадлежащими к семействам липаз и фосфодиэстераз;
- оценить антипролиферативную активность на клеточных линиях опухолей человека, а также изучить фармакокинетические свойства полученных конъюгатов нуклеозидов.

Научная новизна

1. Разработаны эффективные методы синтеза липонуклеотидов, заключающиеся в конденсации универсальных синтонов на основе фосфорамидитных и Н-фосфонатных производных диацилглицеринов с селективно блокированными производными нуклеозидов. Предложенные методы позволяют получать конъюгаты различных нуклеозидов как с 1,2-, так и с 1,3-диацилглицерофосфатами, и избегать побочных продуктов фосфитилирования amino- или амидогруппы гетерооснований нуклеозидов, тем самым увеличивая выходы целевых соединений.

2. Впервые получены конъюгаты нуклеозида рибавирина, обладающего противовирусной активностью, с диацилглицерофосфатами. Осуществлен синтез

новых диацилглицерофосфатных производных ряда нуклеозидов, обладающих противоопухолевой активностью (клофарабина, кладрибина, флударабина).

3. Обнаружена способность 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных нуклеозидов подвергаться ферментативному гидролизу панкреатической фосфолипазой A_2 (ФЛА₂). Показано, что 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатные производные флударабина гидролизуются фосфолипазой Д (ФЛД) из *Streptomyces sp.* и фосфодиэстеразой (ФДЭ) из *Crotalus durissus*.

4. На примере производных флударабина и клофарабина показано, что пероральное либо внутривентральное введение нуклеозид-диацилглицерофосфатов приводит к пролонгированному выделению нуклеозидов в сыворотку крови животных.

Положения, выносимые на защиту

1. Синтез универсальных синтонов на основе фосфорамидитных и Н-фосфонатных производных диацилглицеринов, в том числе ранее неизвестных.

2. Способ получения новых структурно изомерных 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфолипидных конъюгатов нуклеозида рибавирина, обладающего противовирусной активностью, включающий конденсацию нуклеозида, селективно блокированного 2',3'-О-фенилборолиденовой защитной группой, с фосфорамидитными производными липидов.

3. Эффективные методы получения липонуклеотидов конденсацией универсальных синтонов на основе фосфорамидитных и Н-фосфонатных производных диацилглицеринов с нуклеозидами, обладающими противоопухолевой активностью (клофарабином, кладрибином и флударабином), что расширяет возможности синтеза новых фосфолипидных производных нуклеозидов.

4. Влияние структурных особенностей 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатов нуклеозидов на их способность гидролизываться панкреатической ФЛА₂, ФЛД из *Streptomyces sp.*, ФЛС из *Clostridium perfringens* и ФДЭ из *Crotalus durissus*.

5. Пероральное либо внутривентральное введение нуклеозид-диацилглицерофосфатов приводит к пролонгированному выделению нуклеозидов в сыворотку крови животных.

Личный вклад соискателя ученой степени заключается в проведении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении структуры полученных соединений, анализе полученных данных и их статистической обработке, поиске, систематизации и анализе научной и патентной литературы по теме диссертации. Постановка задач, интерпретация результатов, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с д.х.н., чл.-корр.

Е.Н. Калиниченко и к.х.н. Т.И. Кулак. Исследование антипролиферативной активности и фармакокинетики полученных соединений проводилось совместно с сотрудниками лаборатории биоиспытаний (д.м.н., проф. Б.Б. Кузьмицкий, к.б.н. М.Б. Голубева). Анализ ЯМР-спектров выполнен в соавторстве с к.х.н. А.В. Барановским, к.х.н. С.Е. Богушевич, к.х.н. Д.А. Болибрухом.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Материалы диссертационной работы были представлены в виде докладов на Международном конгрессе по органической химии «Butlerov congress» (Казань, 2011), VII Международной конференции «Radostim 2011. Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве» (Минск, 2011), Всероссийской школе-конференции «Химия биологически активных веществ» («ХимБиоАктив-2012») (Саратов, 2012), Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2012), IV и V Международных научных конференциях «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2012 и 2014), Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013), 14th Tetrahedron Symposium «Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry» (Вена, 2013), Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 2014), Drug Discovery Conference (Riga, Latvia, 2015).

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ: 5 статей в рецензируемых научных журналах, из них 3 – в иностранных научных изданиях; 3 статьи в сборниках конференций; тезисы 10 докладов международных конференций и 1 заявка на патент РБ. Общий объём опубликованных работ составил 7,0 авторских листа (из них 4,6 авторских листа – статьи в рецензируемых журналах).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, трёх глав, заключения и библиографического списка. В первой главе приводится обзор литературных данных по синтезу и биологическим свойствам конъюгатов нуклеозидов с липидами. Вторая глава посвящена обсуждению результатов собственных исследований. Третья глава содержит экспериментальные данные. Диссертация изложена на 143 страницах, содержит 11 рисунков и 7 таблиц. Библиографический список включает 198 ссылок на цитируемую литературу на 17 страницах.

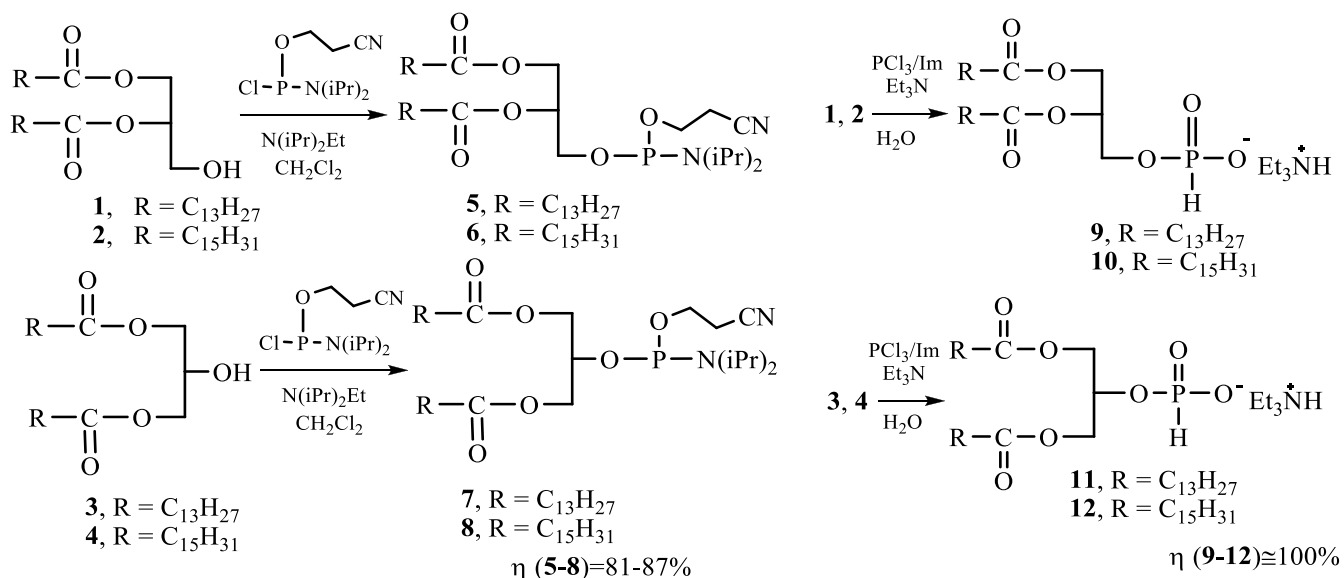
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Липидные производные нуклеозидов (обзор литературы). Обобщены литературные данные по синтезу, фармакокинетике и метаболизму пролекарств на основе фосфолипидных производных нуклеозидов.

Глава 2. Синтез и биологические свойства фосфолипидных конъюгатов нуклеозидов (обсуждение результатов).

2.1 Получение фосфорамидитных и фосфонатных производных диацилглицеринов. Схема синтеза конъюгатов нуклеозидов предполагала получение двух структурных блоков: нуклеозидного (селективно блокированного нуклеозида со свободной 5'-ОН группой) и липидного. В качестве второго использовали фосфорамидитные и Н-фосфонатные производные 1,2- и 1,3-диацилглицеринов. Такой подход обоснован тем, что, во-первых, полученные липидные блоки представляют собой универсальные синтоны, которые можно использовать в реакциях конденсации со многими нуклеозидами. Во-вторых, свободная первичная 5'-ОН группа селективно блокированных нуклеозидов более активна в реакциях конденсации, чем вторичная гидроксильная группа 1,3-диацилглицеринов.

1,2-Диацилглицерины **1**, **2** с заданной конформацией хирального центра были синтезированы с использованием известных методов, исходя из D-маннита, а их ахиральные 1,3-изомеры **3**, **4** – термической изомеризацией 1,2-изомеров.

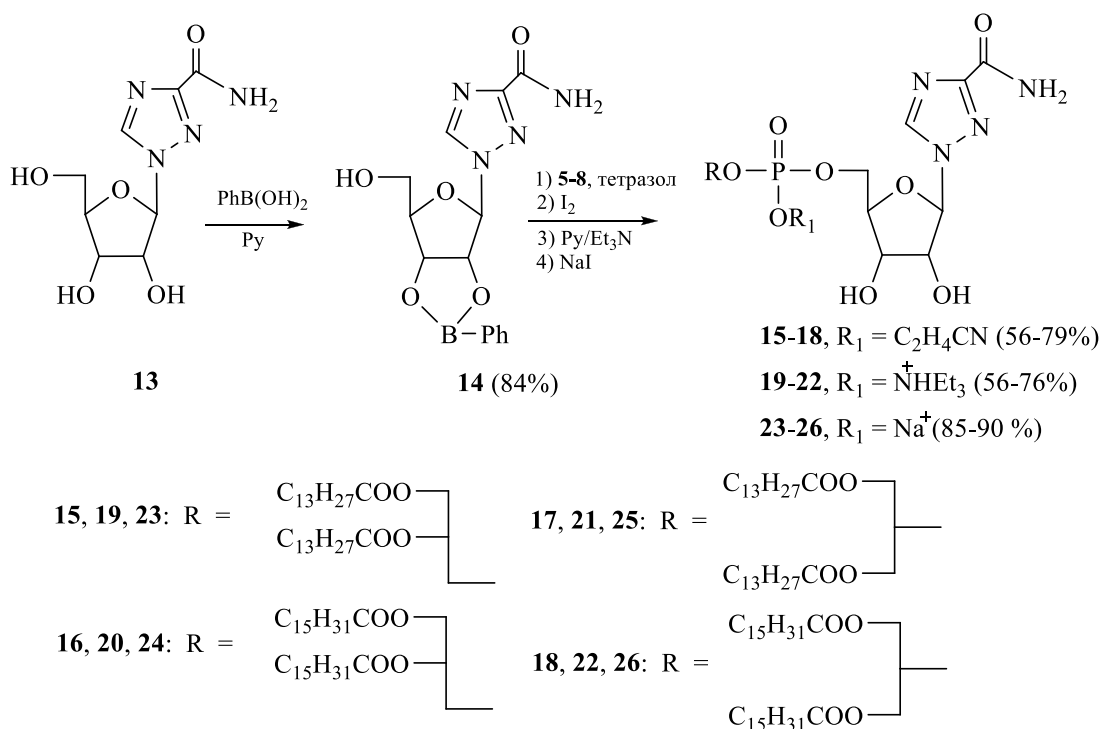


Для получения ранее неизвестных фосфорамидитных производных диацилглицеринов **5-8** в качестве фосфитилирующего агента использовали 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит. Выбор данного соединения

был обоснован его коммерческой доступностью, а также простотой получения и очистки, которая достигается обычной вакуумной перегонкой. Кроме того, принималась во внимание легкость удаления 2-цианэтильной защитной группы при последующем деблокировании продуктов конденсации. Обработка диацилглицеринов **1-4** 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидитом в дихлорметане в присутствии N-диизопропилэтиламина приводила к образованию 3(2-)фосфорамидитных производных липидов **5-8**, которые были выделены в виде самопроизвольно кристаллизующихся масел колоночной хроматографией на оксиде алюминия с высокими выходами.

Н-Фосфонатные производные **9-12** получали обработкой диацилглицеринов **1-4** три(имидазолил)фосфином в дихлорметане в присутствии триэтиламина и последующим водным гидролизом реакционной смеси с практически количественным выходом. Н-фосфонаты **11** и **12** получены нами впервые.

2.2 Получение конъюгатов 1-(β-D-рибофуранозил)-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирина) с фосфолипидами. Разработан способ получения фосфолипидных производных рибавирина фосфорамидитным методом, основанный на применении комбинации легко удаляемой 2',3'-О-фенилборолиденовой защитной группы для углеводного фрагмента рибавирина и 2-цианоэтильной группы для фосфатной части молекулы конъюгата, позволяющий получать целевые соединения с хорошими выходами посредством малого количества стадий. Кроме того, данный подход обеспечивает стабильность ацильных групп глицеринового скелета на всех стадиях синтеза, что приводит к отсутствию примесей структурных изомеров.



2',3'-О-Фенилборонат **14** был получен кипячением рибавирина (**13**) с эквимолярным количеством фенилборной кислоты в абсолютном пиридине и выделен из реакционной смеси кристаллизацией с выходом 84%.

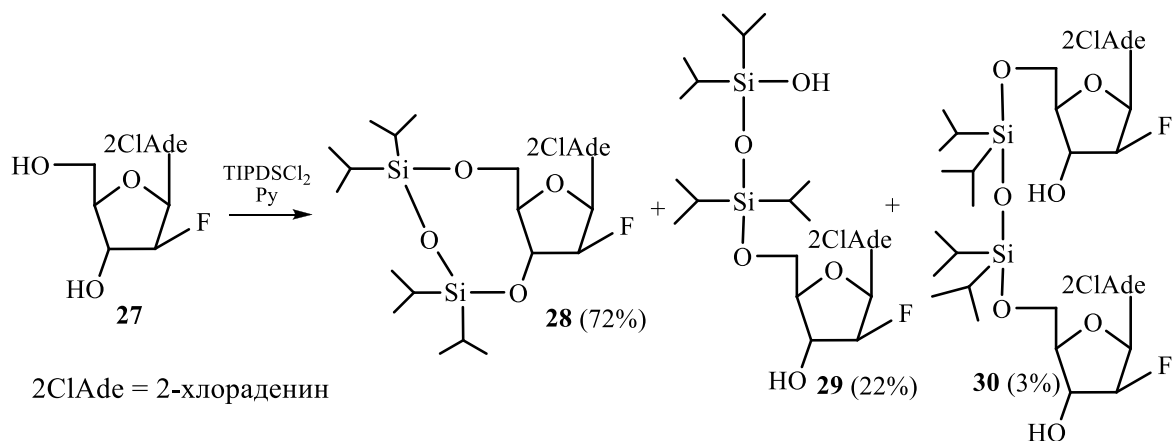
Конденсация нуклеозида **14** с фосфорамидитами **5-8** в ацетонитриле в присутствии 1*H*-тетразола с последующим окислением раствором I_2 приводила к получению фосфотриэфиров **15-18** и сопровождалась снятием 2',3'-О-фенилборонатной защиты. После выделения колоночной хроматографией на силикагеле соединения **15-18** были получены с выходами 56-79%, соответственно.

Удаление 2-цианоэтильной защитной группы фосфотриэфиров **15-18** осуществляли обработкой смесью Py/Et_3N (1:1). Триэтиламмониевые соли **19-22** были выделены колоночной хроматографией на силикагеле с выходами 56-76%, а затем переведены в порошкообразные натриевые соли **23-26** с выходами 82-90%.

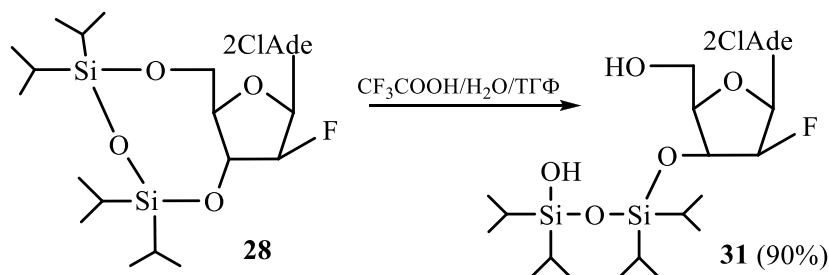
2.3 Получение фосфолипидных производных 2-хлор-9-(2-дезоксидефтор-β-D-арабинофуранозил)аденина (клофарабина). Разработаны схемы синтеза 1,2 и 1,3-диацилглицерофосфатных производных клофарабина с использованием 1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксановой защитной группы (TIPDS) по углеводному фрагменту нуклеозида. Показано, что использование TIPDS-группы в случае клофарабина эффективнее в плане количества стадий синтеза и выходов целевого продукта по сравнению с традиционной комбинацией монометокситритильной и третбутилдиметилсилильной защитных групп.

Фосфолипидные производные клофарабина были получены как фосфорамидитным, так и Н-фосфонатным способом синтеза. Важным преимуществом предложенных схем получения фосфолипидных производных клофарабина является отсутствие необходимости блокирования/деблокирования аминогруппы пуринового гетероцикла.

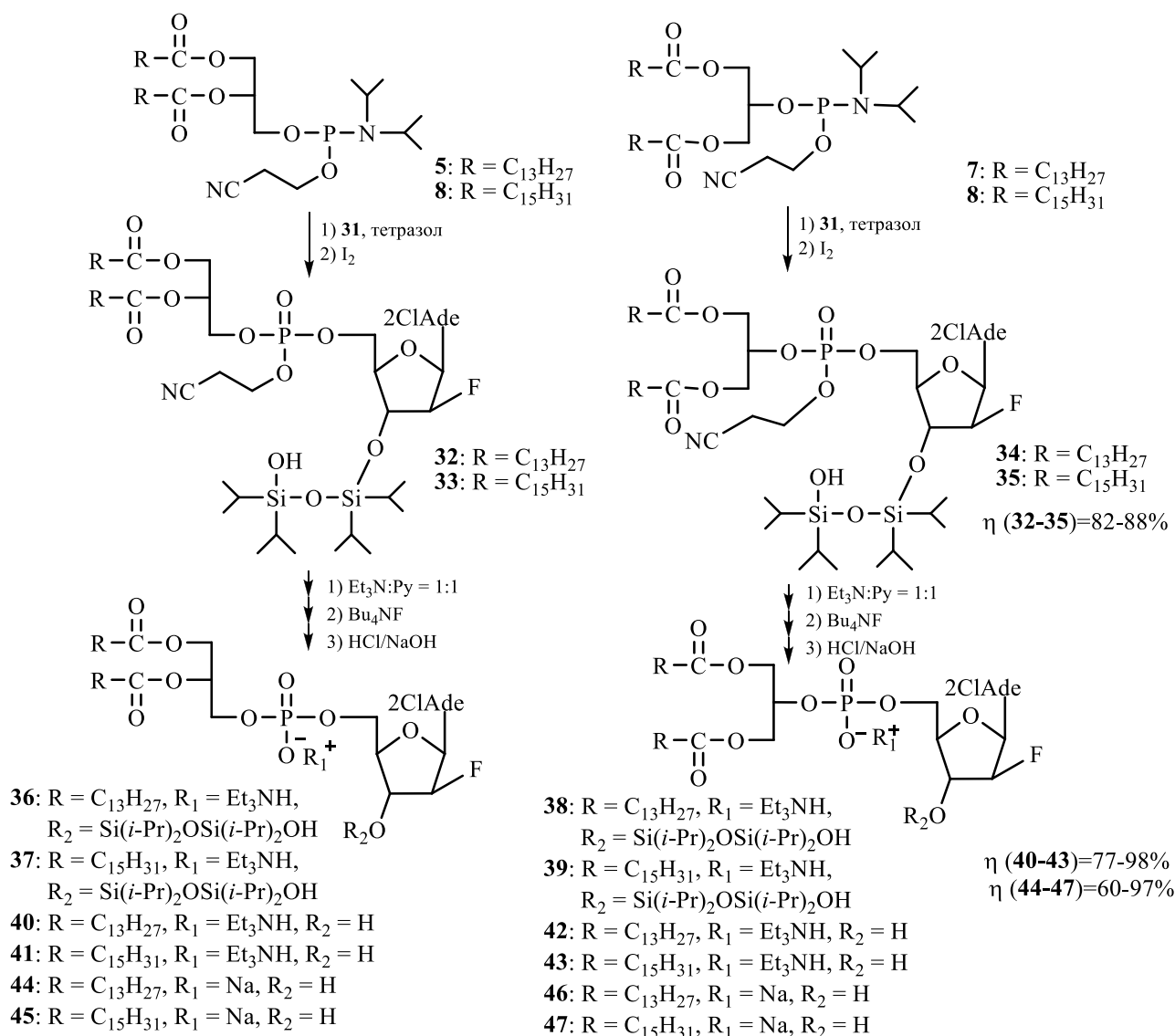
Обработка клофарабина (**27**) 1,1,3,3-тетраизопропилдисиоксан-1,3-дихлоридом в пиридине приводила к образованию циклического 3',5'-О-TIPDS-производного клофарабина **28**, наряду с 5'-О-монозамещенным производным **29** и бис(нуклеозид)силоксаном **30** с выходами 72%, 22 и 3%, соответственно.



Одним из важных свойств 3',5'-O-TIPDS-производных нуклеозидов является то, что в кислой среде происходит их селективное деблокирование по наименее стерически затрудненному 5'-положению, приводящее к образованию 3'-O-монозамещенных производных. Обработка нуклеозида **28** смесью $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{ТГФ}$ (1:1:4) при 0°C в течение 3 ч приводила к образованию 3'-O-силильного производного **31**, выделенного с выходом 90%.



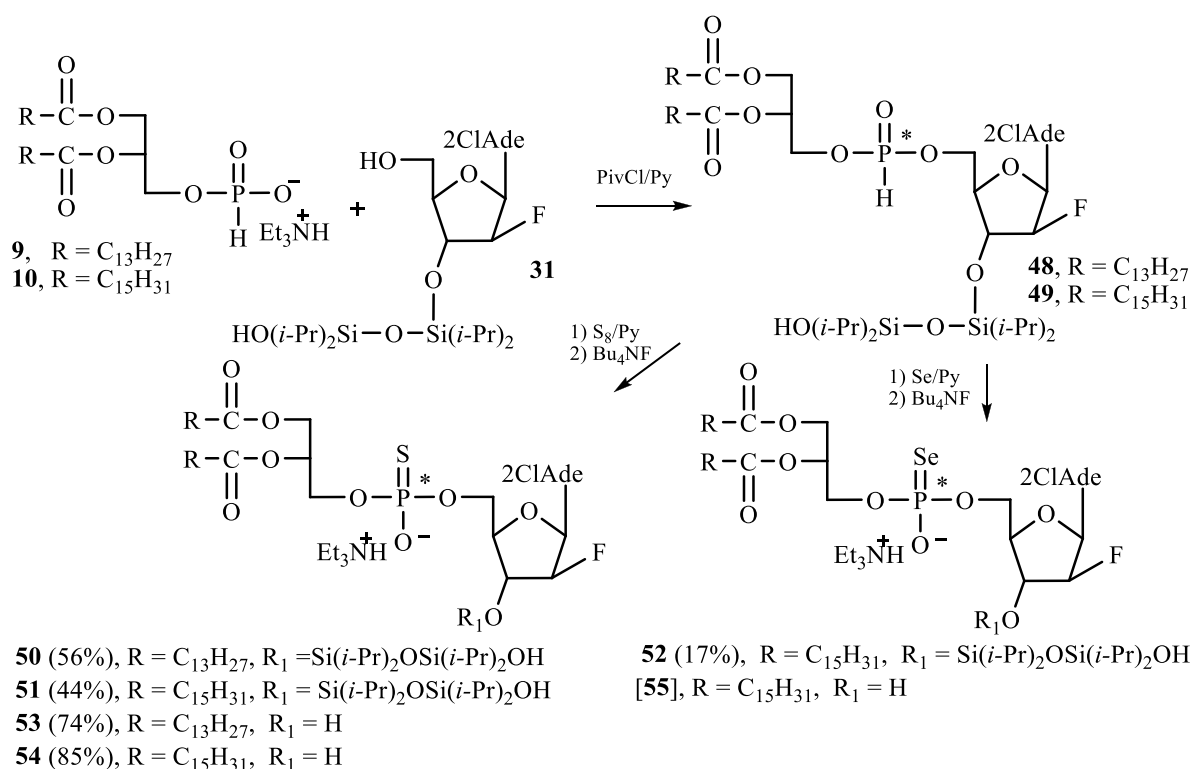
Конденсация соединения **31** и фосфорамидитов **5-8** в CH_2Cl_2 в присутствии тетразола и последующие окисление реакционной смеси I_2 приводили к получению фосфотриэфиров **32-35** с суммарными выходами 82-88%.



Удаление 2-цианоэтильной группы производили обработкой смесью $\text{Py}/\text{Et}_3\text{N}$ (1:1), а TIPDS-группы - раствором TBAF в ТГФ. После колоночной хроматографии на силикагеле конъюгаты **40-43** были выделены в виде триэтиламмониевых солей с суммарными выходами на стадиях деблокирования 77-98%, а затем переведены в порошкообразные натриевые соли **44-47** с выходами 60-97%.

Для поиска пролекарств, обладающих новыми перспективными свойствами, были проведены исследования по синтезу конъюгатов клофарабина с 1,2-диацилглицеротио- и -селенофосфатами.

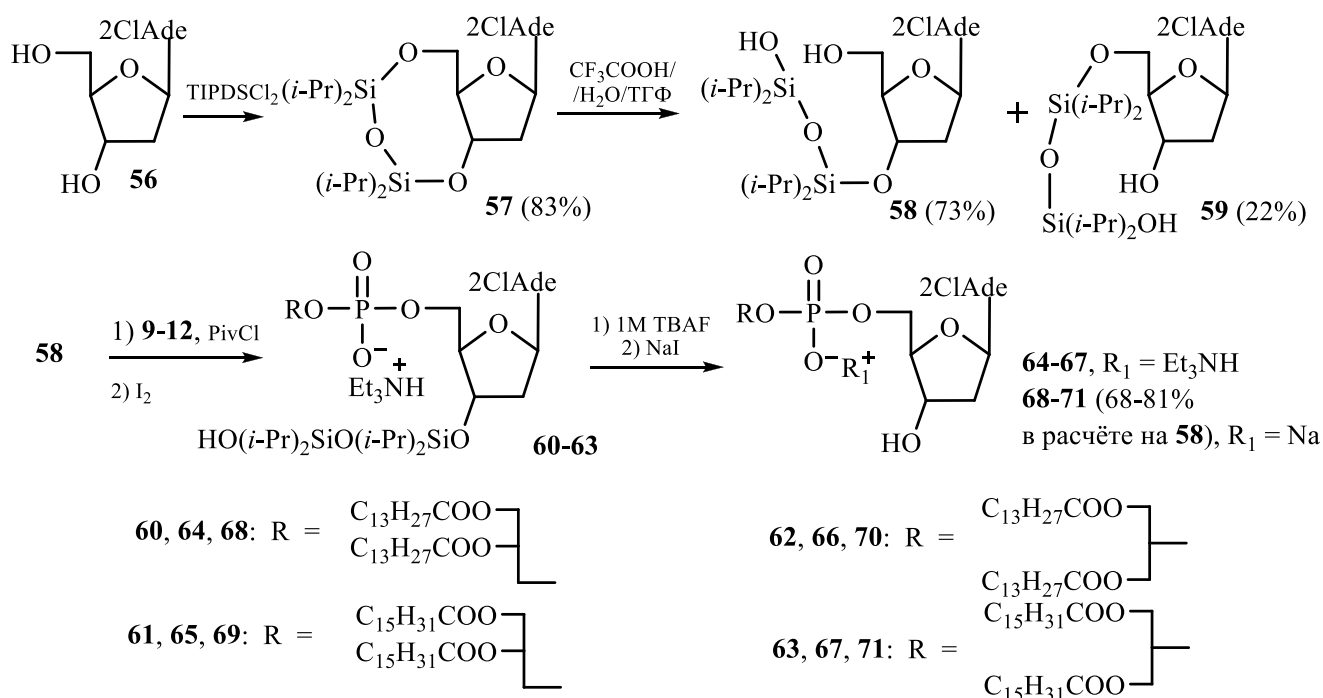
Синтез тио- и селенофосфатных производных клофарабина проводили Н-фосфонатным методом с последующим окислением избытком серы или селена в пиридине и деблокированием углеводного фрагмента (TBAF в ТГФ). В результате реакции конденсации нуклеозида **31** с Н-фосфонатами **9** и **10** образуются Н-фосфонаты **48** и **49**, представляющие собой смеси диастереоизомеров по атому фосфора. Н-Фосфонаты **48** и **49**, полученные в результате обработки реакционных смесей, подвергали дальнейшим превращениям без разделения диастереоизомеров и дополнительной очистки.



Тиопроизводные **53** и **54** получали с суммарными выходами 41 и 37%, соответственно. Выход селенопроизводного **52** был значительно ниже (17%). Низкие выходы селенопроизводных на стадии получения из фосфонатов обусловлены, вероятно, неэффективностью элементарного селена в данной реакции вследствие его плохой растворимости в органических растворителях и невысокой реакционной способности. При деблокировании углеводного фрагмента

селенофосфатного производного **52** конъюгат **55** не удалось выделить из реакционной смеси в индивидуальном виде, т.к. в условиях эксперимента происходило его окисление до фосфодиэфира **41**.

2.4 Синтез 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатов 2-хлор-2'-дезоксиаденозина (кладрибина). Получены новые конъюгаты кладрибина с 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатами. Синтез фосфолипидных производных кладрибина осуществлен Н-фосфонатным методом с использованием TIPDS-защитной группы. Предложенная схема получения конъюгатов кладрибина позволила синтезировать целевые соединения **68-71** с высокими суммарными выходами (68-81% на трех стадиях синтеза).



Обработкой кладрибина (**56**) TIPDSCl₂ в пиридине получали циклическое 3',5'-О-TIPDS-производное **57** (83%). Селективное деблокирование 5'-ОН группы соединения **57** смесью CF₃COOH/H₂O/ТГФ (1:1:4) в течение 2,5 ч при 0°C давало 3'-О-силильный нуклеозид **58**, который после колоночной хроматографии был получен с выходом 73%. Из реакционной смеси также было выделено изомерное 5'-О-силильное производное **59** (22%). Конденсацию Н-фосфонатов **9-12** и нуклеозида **58** проводили так же, как и в случае с клофарабином.

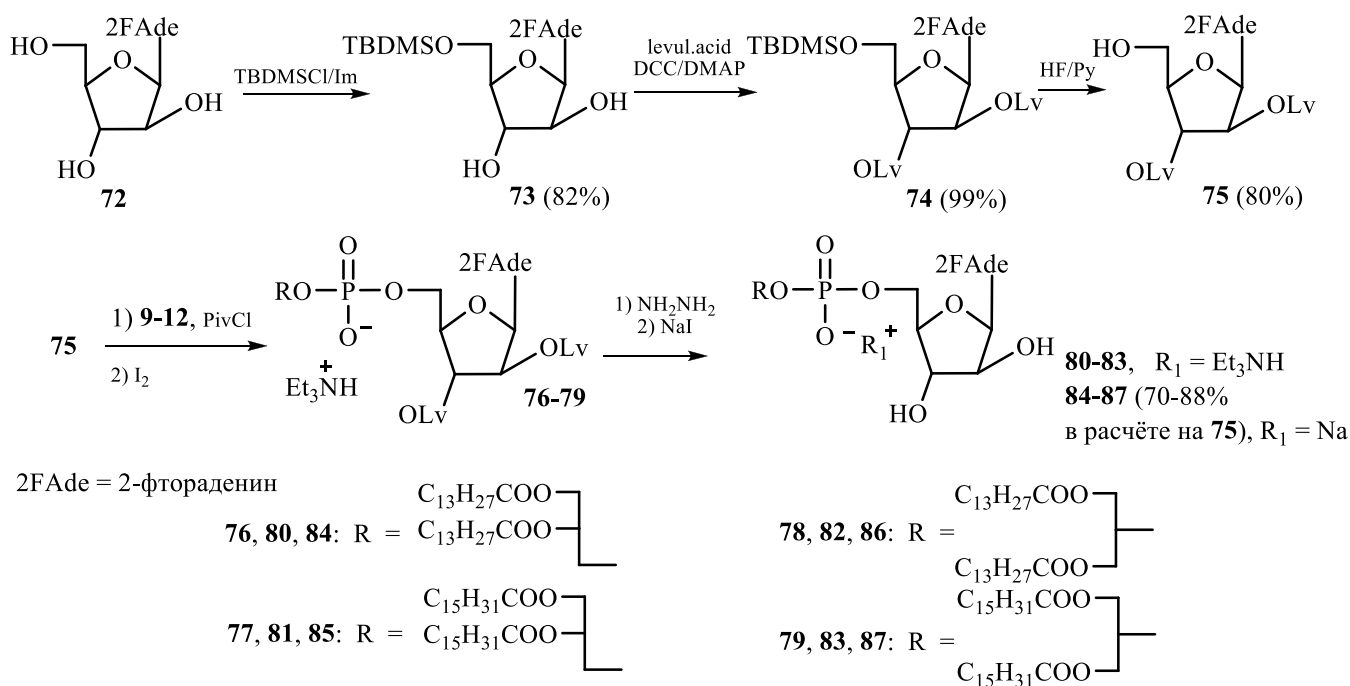
2.5 Получение фосфолипидных конъюгатов 9-β-D-арабинофуранозил-2-фтораденина (флударабина, F-ara-A). Осуществлен синтез ранее неизвестных конъюгатов нуклеозида флударабина, обладающего противоопухолевой активностью, с 1,2-диацилглицерофосфатами и их 1,3-изомерами с

использованием Н-фосфонатного подхода и комбинации трет-бутилдиметилсилильной и левулиновой защитных групп для углеводного фрагмента молекулы.

Установлено, что стратегия синтеза фосфолипидных конъюгатов нуклеозидов, основанная на применении TIPDS-защитной группы по углеводному фрагменту, которая была успешно использована для получения производных клофарабина и кладрибина, не является эффективной в случае производных 2-фтораденина, вследствие высокой лабильности этих соединений в кислой среде.

Обработка флударабина (F-ara-A, **72**) TBDMSCl в ДМФА в присутствии имидазола приводила к получению 5'-О-силилированного нуклеозида **73** с выходом 82%.

Ацилированием соединения **73** (5'-О-TBDMS-F-ara-A) левулиновым ангидридом был получен 2-фтор-9-[5'-О-(*трет*-бутилдиметилсилил)-2',3'-ди-О-левулинил-1-β-D-арабинофуранозил]аденин (**74**) с выходом 99%. Следует отметить, что в данных условиях не происходило ацилирования по 6-аминогруппе 2-Ф-аденозина. Обнаружено, что деблокирование 5'-О-TBDMS-производного флударабина гладко протекает под действием комплекса HF/Py при 0-5°C с выходом 80%.



Конденсацию Н-фосфонатов липидов (**9-12**) и нуклеозида **75**, а также последующее окисление реакционной смеси, проводили аналогично производным кладрибина. Левулиновые защитные группы удаляли обработкой гидразингидратом в пиридине, содержащем 20% уксусной кислоты, и выделяли триэтиламмониевые соли **80-83**, которые затем переводили в натриевые соли **84-87** с суммарными выходами 70-88% в расчёте на нуклеозид **75**.

2.6 Антипролиферативная активность синтезированных диацилглицерофосфатных производных пуриновых нуклеозидов *in vitro*.

Испытание антипролиферативной активности конъюгатов клофарабина, кладрибина и флударабина с диацилзамещенными глицерофосфатами показало, что изученные соединения значительно различаются по активности в отношении тестируемых линий клеток. 1,2-Димиристоилглицерофосфатные производные клофарабина, кладрибина и флударабина в данных экспериментах *in vitro* проявили наибольшую антипролиферативную активность. В целом, испытываемые соединения характеризуются невысокой *in vitro* активностью по сравнению с исходными нуклеозидами в тех же концентрациях (Таблица 1, 2). Обнаружено, что полученные конъюгаты проявляют непрофильную активность (ингибируют солидные опухолевые клеточные линии).

Таблица 1. – *In vitro* антипролиферативная активность конъюгатов клофарабина **44-47**, IC₅₀^{*}, мкМ

Клеточные линии	Соединение				
	27	44	45	46	47
HL-60	0,1	0,8	10,0	>100	55,0
A549	8,0	>100	>100	>100	90,0
MCF-7	50,0	40,0	>100	40,0	30,0
HeLa	50,0	50,0	>100	>100	100,0

*IC₅₀ – концентрация соединения, которая ингибирует рост клеток на 50% в сравнении с контролем.

Таблица 2. – *In vitro* антипролиферативная активность кладрибина и его фосфолипидных производных **68-71**, IC₅₀¹⁾ (мкМ)

Клеточные линии	Соединение				
	56	68	69	70	71
MOLT-3	2,3±0,67	8±2,91 ⁴⁾	>100	>100	>100
KG-1	0,2±0,04	17±2,75 ²⁾	ND	ND	ND
K-562	10±2,02	50±13,43 ³⁾	>100	>100	>100
RPMI-8226	6±2,47	>100	ND	ND	ND
SK-HEP-1	4±0,91	>100	ND	ND	ND
MCF-7	45±14,57	>100	>100	>100	>100
ZR-75-1	>100	>100	ND	ND	ND
SK-UT-1B	1±0,53	>100	ND	ND	ND

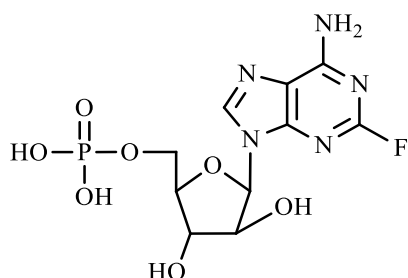
¹⁾ IC₅₀ – концентрация соединения, которая ингибирует рост клеток на 50% в сравнении с контролем. Значения IC₅₀ представлены в виде X ± SD (среднее ± стандартное отклонение) из трёх независимых экспериментов, сделанных в трипликате.

Уровень достоверности P<0,05 принимали статистически значимым.

²⁾ P<0,001, ³⁾ P<0,01, ⁴⁾ P<0,05. ND = не определяли.

Показано, что при увеличении времени экспозиции (72 ч по сравнению с 48 ч) усиливается проявление ингибирующего эффекта, что

может быть связано с медленным высвобождением действующего вещества из липидных производных *in vitro* под действием клеточных ферментов. Обнаружено, что активность конъюгатов практически сравнивается с активностью контрольного нуклеозида в максимальных концентрациях (10-100 мкМ). Полученные результаты антипролиферативной активности *in vitro* исследуемых конъюгатов находятся в соответствии с известными данными о сниженной активности липидных конъюгатов в сравнении с немодифицированными нуклеозидами *in vitro*. Липидные производные нуклеозидов часто показывают улучшенные биокинетические свойства *in vivo*, наряду с равной или даже повышенной активностью в сравнении с исходными нуклеозидами (Таблица 3).



88, F-ara-AMP, 5'-монофосфат флударабина

Таблица 3. – *In vitro* антипролиферативная активность F-ara-AMF (**88**) и его липидных производных **84-87**, IC₅₀¹⁾ (мкМ), 48 ч (72 ч)

Клеточные линии	Соединение				
	88	84	85	86	87
HL-60	0,09±0,02	30±3,61 ²⁾ (16±3,59) ³⁾	>100	80±8,90 ²⁾ (65±13,23) ³⁾	>100
KG-1	0,15±0,03	55±15,00 ⁴⁾ (9±1,66) ²⁾	>100 (75±13,23) ²⁾	>100 (35±5,00) ²⁾	>100
K-562	0,40±0,05	45±8,66 ²⁾ >100	>100	75±14,80 ⁴⁾ (>100)	>100
MOLT-3	0,95±0,38	>100	>100	>100	>100
Raji	0,40±0,09	>100	>100	>100	>100
MCF-7	0,13±0,02	45±13,23 ⁴⁾ (18±6,08) ⁴⁾	>100	>100 (45±8,39) ²⁾	>100
ZR-75-1	0,6±0,1	>100	>100	>100 (75±40,28) ⁵⁾	>100
SK-UT-IB	6,0±0,87	>100	>100	>100 (55±15,00) ⁴⁾	>100
M-HeLa cl. II	2,0±0,87	>100	>100	>100 (45±13,20) ⁴⁾	>100

¹⁾ IC₅₀ – концентрация соединения, которая ингибирует рост клеток на 50% в сравнении с контролем. Значения IC₅₀ представлены в виде X ± SD (среднее ± стандартное отклонение) из трёх независимых экспериментов, сделанных в трипликате.

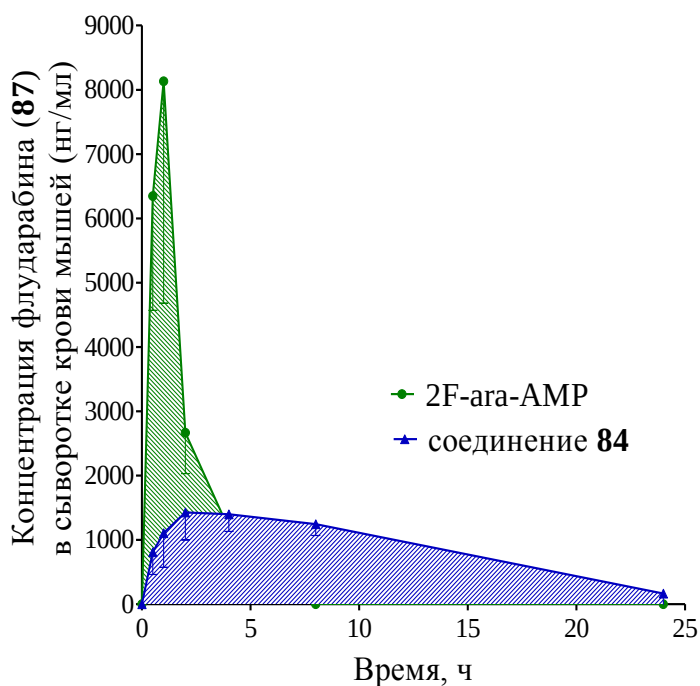
Уровень достоверности P<0,05 принимали статистически значимым.

²⁾ P<0,001, ³⁾ P<0,002, ⁴⁾ P<0,01, ⁵⁾ P<0,05. ND = не определяли.

2.7 Фармакокинетические свойства фосфолипидных производных нуклеозидов.

2.7.1-2. Фармакокинетические свойства диацилглицерофосфатных конъюгатов флударабина и 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного клофарабина. На основании результатов изучения фармакокинетических свойств конъюгатов флударабина, введенных внутривенно (в/в) крысам Вистар, для дальнейшего исследования было выбрано 1,2-димиристоилглицерофосфатное производное **84**, которое характеризовалось наибольшей биодоступностью.

Установлено, что внутривенное введение мышам ICR 1,2-димиристоилглицерофосфатного конъюгата флударабина **84** в сравнении с введением эквимольных количеств флударабина фосфата приводит к уменьшению максимальной концентрации, увеличению времени достижения максимальной концентрации, снижению скорости элиминации нуклеозида, а, следовательно, к его пролонгированному высвобождению в сыворотку крови (Рисунок 1).



Значения представлены в виде $\bar{X} - SD$ (среднее значение - стандартное отклонение) из пяти независимых экспериментов

Рисунок 1. – Концентрация F-ara-A в сыворотке крови аутбредных мышей ICR после в/в введения F-ara-AMP (50 мг/кг) и конъюгата 84 (120,4 мг/кг)

Установлено, что оральная биодоступность флударабина из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного **84** у животных близка к его оральной биодоступности из эквимольного количества флударабина фосфата (Таблица 4).

Аналогичные закономерности получены и для 1,2-димиристоил-глицерофосфатного конъюгата клофарабина **44**, введенного внутрибрюшинно крысам Вистар. Показно, что относительная биодоступность клофарабина из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного конъюгата **44** при внутрибрюшинном введении составляет почти 100% (Таблица 5).

Таблица 4. – Фармакокинетические параметры* F-ara-A у мышей ICR после внутрижелудочного введения F-ara-AMP и конъюгата **84**

Параметры	F-ara-AMP	Конъюгат 84	P
$C_{\max}$ (нг/мл)	8989 ± 2537	1613 ± 247	0,001
$T_{\max}$ (ч)	$0,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 1,1$	0,01
$AUC_{0 \rightarrow 24}$ (нг·ч/мл)	17790 ± 1934	19368 ± 1411	0,25
$T_{1/2}$ (ч)	$1,5 \pm 0,4$	$14,2 \pm 2,6$	0,001
C_{ss} (нг/мл)	741 ± 81	807 ± 59	0,25
$C_{\min}$ (нг/мл)	13 ± 9	199 ± 31	0,001
f , ч ⁻¹	$0,506 \pm 0,126$	$0,084 \pm 0,019$	0,001
F, %	100	108	

*Значения фармакокинетических параметров представлены в виде $X \pm SD$ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) пяти независимых экспериментов.

Уровень достоверности $P < 0,05$ принимали статистически значимым.

Таблица 5. – Фармакокинетические параметры клофарабина после внутрибрюшинного введения 25 мг/кг клофарабина и 75 мг/кг конъюгата **44**

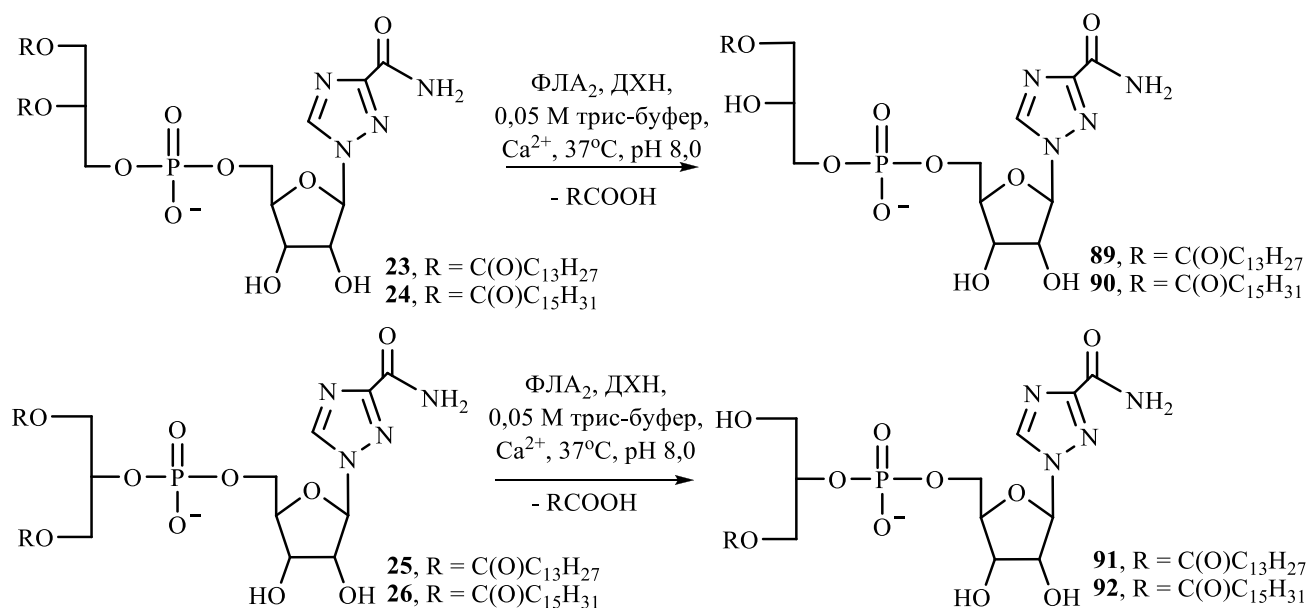
Параметры	Клофарабин	Конъюгат 44
$C_{\max}$ (нг/мл)	3546	1369
$T_{\max}$ (ч)	0,5	4
$T_{1/2}$ (ч)	3,4	8
$AUC_{0 \rightarrow 24}$ (нг·ч/мл)	16364	16247
F, %	100	99

2.8 Энзиматический гидролиз фосфолипидных конъюгатов нуклеозидов.

2.8.1 Гидролиз конъюгатов рибавирина панкреатической ФЛА₂.

Показано, что в большинстве случаев конъюгаты нуклеозидов с липидами сами по себе не являются активными. В организме они должны подвергнуться ферментативному гидролизу, приводящему к высвобождению биологически активного соединения. Модель ферментативного расщепления является широко используемым подходом для оценки липидных систем доставки лекарств *in vitro*.

В результате ферментативного гидролиза фосфолипидных конъюгатов рибавирина панкреатической ФЛА₂ образуется лизо-производное и выделяется одна молекула жирной кислоты.



Гидролиз 1,3-диацилглицерофосфатов рибавирина панкреатической ФЛА₂ протекает значительно медленнее по сравнению с гидролизом их 1,2-изомеров (Таблица 6).

Таблица 6. – Данные энзиматического гидролиза конъюгатов рибавирина

Соединение	V_0 , мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	$\tau_{1/2}$, мин
23	16	15
24	29	5
25	1,5	150
26	1,7	80

Полученные данные по времени половинного гидролиза конъюгатов рибавирина, а также динамике образования продуктов реакции, свидетельствуют о высокой чувствительности 1,2-липонуклеозидных конъюгатов к действию панкреатической ФЛА₂, в отличие от 1,3-изомерных аналогов.

2.8.2 Энзиматический гидролиз фосфолипидных конъюгатов флударабина. В экспериментах *in vitro* показано, что как 1,2-, так и 1,3-диацилглицерофосфолипидные производные флударабина **84-87** могут подвергаться гидролизу под действием ФЛА₂ из поджелудочной железы свиньи, ФЛД из *Streptomyces* sp. и ФДЭ из змеиного яда. Конъюгаты **84-87** не являются субстратами ФЛС из *Clostridium perfringens*.

Состав реакционных смесей энзиматического гидролиза анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

В результате гидролиза фосфолипидных конъюгатов флударабина **84-87** панкреатической ФЛА₂ образуется лизо-производное и выделяется одна молекула жирной кислоты. Показано, что между 1,2- и 1,3-изомерами существуют значительные различия в начальной скорости гидролиза и времени половинного гидролиза. Установлено, что 1,3-фосфолипидные производные флударабина гидролизуются медленнее их 1,2-изомеров (Таблица 7).

Было обнаружено, что инкубация конъюгатов **84-87** с ФЛД из *Streptomyces sp.* приводит к выделению исходного нуклеозида и образованию 3- или 2-глицерофосфата. Также, как и в случае с ФЛА₂, гидролиз 1,2-изомеров протекал заметно быстрее в сравнении с 1,3-изомерами.

В различных монофазных и двухфазных системах показано, что конъюгаты флударабина **84-87** не являлись субстратами ФЛС из *Clostridium perfringens* (*C. welchii*).

В ходе модельных экспериментов в результате гидролиза конъюгатов флударабина ФДЭ из *Crotalus durissus* образуется 1,2- или 1,3-диацилглицерин и молекула 5'-монофосфата флударабина. Показано, что в отличие от гидролиза ФЛА₂ и ФЛД, гидролиз 1,3-конъюгатов флударабина происходил быстрее, чем 1,2-изомеров, хотя в обоих случаях степень гидролиза была крайне низкой (Таблица 7).

Таблица 7. – Данные энзиматического гидролиза конъюгатов флударабина

Параметры	84	85	86	87
ФЛА ₂ *				
$\tau_{1/2}$ (мин)	8,8 ± 1,8	14,7 ± 2,5	153,0 ± 14,1	242,0 ± 21,9
V_0 (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹)	5,9 ± 1,7	3,1 ± 1,4	0,42 ± 0,07	0,38 ± 0,09
ФЛД*				
Степень гидролиза, α_{24h} (%)	50,9 ± 7,9	36,4 ± 13,1	3,3 ± 0,7	7,3 ± 1,4
ФДЭ**				
Степень гидролиза, α_{48h} (%)	2,1 ± 0,7	1,4 ± 0,2	3,4 ± 0,5	2,2 ± 0,6
Степень гидролиза, α_{168h} (%)	4,5 ± 0,9	3,1 ± 0,6	18,1 ± 4,5	9,9 ± 2,4

* Данные представлены в виде $X \pm SD$ (среднее значение ± стандартное отклонение) из трёх независимых экспериментов.

** Данные представлены в виде $X \pm SD$ (среднее значение ± стандартное отклонение) из двух независимых экспериментов.

Способность липонуклеотидов гидролизоваться различными ферментами свидетельствует о том, что такие соединения могут включаться в метаболические пути организма. А так как скорость гидролиза изомерных конъюгатов различается, то, следовательно, будут различаться и фармакокинетические свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработаны эффективные методы синтеза новых структурно изомерных конъюгатов терапевтически значимых нуклеозидов с 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатами с использованием универсальных синтонов на основе фосфорамидитных и Н-фосфонатных производных диацилглицеринов. Предложены рациональные комбинации защитных групп для нуклеозидов рибо-, арабино- и 2'-дезоксид-рядов, а также оптимальные схемы их деблокирования, что обеспечивает стабильность ацильных групп фосфолипидного фрагмента и отсутствие примесей структурных изомеров и позволяет получать целевые конъюгаты с высокими выходами [1-4, 6, 7, 9-12, 16-18, 19].

2. Впервые получены конъюгаты нуклеозида рибавирина, обладающего противовирусной активностью, с диацилглицерофосфатами. Предложен эффективный вариант фосфорамидитного способа синтеза данных соединений, основанный на использовании комбинации легко удаляемой 2',3'-О-фенилборолиденовой защитной группы для углеводного фрагмента нуклеозида и 2-цианоэтильной группы для фосфатной части молекулы конъюгата [2, 6, 9, 18].

3. Синтезированы новые диацилглицерофосфатные производные нуклеозидов, обладающих противоопухолевой активностью (клофарабина и кладрибина). Разработаны схемы получения указанных соединений, основанные на использовании только одной 1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксандиальной защитной группы по углеводному фрагменту нуклеозида, что устраняет необходимость блокирования/деблокирования аминогруппы пуринового гетероцикла и не оказывает влияния на стабильность атомов галогенов в нуклеозидах. Осуществлен синтез новых 1,2-диацилглицеротифосфатных производных клофарабина [1, 3, 4, 7, 10-13, 16-19].

4. Впервые получены конъюгаты нуклеозида флударабина, обладающего противоопухолевой активностью, с диацилглицерофосфатами. Показано, что при использовании комбинации трет-бутилдиметилсилильной и левулиновой защитных групп по углеводному фрагменту нуклеозида в реакционных смесях не наблюдается продуктов замещения атома фтора в пуриновом гетероцикле в условиях деблокирования под действием комплекса HF/Py, а предложенный метод синтеза позволяет получать целевые соединения с высокими препаративными выходами [4, 14, 16, 18].

5. Показано, что 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфолипидные производные рибавирина и флударабина могут подвергаться гидролизу под действием ФЛА₂ из поджелудочной железы свиньи, ФЛД из *Streptomyces sp.* и ФДЭ из *Crotalus durissus*, но не являются субстратами ФЛС из *Clostridium perfringens*. Установлено, что 1,3-диацилглицерофосфатные производные медленнее

гидролизуются ФЛА₂ и ФЛД, но быстрее ФДЭ в сравнении с их 1,2-изомерами [2, 5].

6. Определены фармакокинетические параметры фосфолипидных конъюгатов клофарабина и флударабина. Установлено пролонгированное выделение нуклеозидов из их 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных в сыворотку крови животных, сопровождающееся уменьшением максимальной концентрации нуклеозида в сыворотке крови, увеличением времени достижения максимальной концентрации и снижением скорости элиминации нуклеозида [4, 5, 8, 15].

7. Показано, что у аутбредных мышей ICR оральная биодоступность флударабина из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного близка к оральной биодоступности нуклеозида из эквимольного количества флударабина фосфата. Установлено, что у крыс Вистар относительная биодоступность клофарабина из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного при внутрибрюшинном введении составляет 100% [4, 5, 8, 15].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Для практического использования представляют интерес полученные в данной работе новые липонуклеотиды - конъюгаты терапевтически значимых нуклеозидов с 1,2-диацилглицерофосфолипидами и их 1,3-изомерами, а также методы их синтеза. Полученные конъюгаты способны проходить начальную стадию метаболизма под действием клеточных липаз и пролонгированно высвобождать нуклеозид в сыворотку крови, вследствие чего могут быть использованы в качестве депо-форм биологически активных нуклеозидов.

Особый интерес синтезированные диацилглицерофосфатные производные нуклеозидов могут представлять для создания на их основе пероральных таблетированных или капсулированных форм противоопухолевых и противовирусных лекарственных препаратов пролонгированного действия. Полученные данные о фармакокинетических свойствах нуклеозид-диацилглицерофосфатов дают основание полагать, что использование указанных производных может позволить избежать возникновения токсических концентраций действующих веществ в организме, особенно в начальный период после введения.

Список публикаций соискателя

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Синтез фосфолипидных производных 2-хлор-9-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-арабинофунозил)аденина (клофарабина) / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, А.В. Барановский, Е.Н. Калиниченко // Докл. НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 5. – С. 54–59.

2. Synthesis of phospholipid-ribavirin conjugates / **I.A. Oleynikova**, T.I. Kulak, D.A. Bolibrukh, E.N. Kalinichenko // *Helv. Chim. Acta.* – 2013. – Vol. 96, № 3. – P. 463–472.

3. Synthesis and *in vitro* cytostatic activity of 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphates of clofarabine / **I. Tsybulskaya**, T. Kulak, A. Baranovsky, M. Golubeva, B. Kuzmitsky, E. Kalinichenko // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21, № 17. – P. 5414–5419.

4. Phospholipid derivatives of cladribine and fludarabine: Synthesis and biological properties / **I. Tsybulskaya**, T. Kulak, E. Kalinichenko, A. Baranovsky, S. Bogushevich, M. Golubeva, B. Kuzmitsky // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23, № 13 – P. 3287–3296.

5. Фармакокинетические свойства и энзиматический гидролиз диацилглицерофосфатных производных флударабина / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Т.Н. Буравская, М.Б. Голубева, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.В. Курман, Е.Н. Калиниченко // *Докл. НАН Беларуси.* – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 70–76.

Статьи в сборниках трудов международных конференций:

6. **Олейникова, И.А.** Конъюгаты противовирусного препарата Рибавирин с 1,2-дизамещёнными глицерофосфатами / И.А. Олейникова, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко // *Radostim 2011. Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве : сборник статей VII международной конференции, Минск, 2–4 ноября 2011 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси.* – Минск, 2011. – С.126–128.

7. **Цибульская, И.А.** Конъюгаты кладрибина с глицерофосфолипидами / И.А. Цибульская, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко // *Всероссийская школа-конференция Химия биологически активных веществ «ХимБиоАктив-2012» : сборник статей, Саратов, 24–28 сентября 2012 г. / Издательство «КУБиК» ; редкол.: О.В. Федотова [и др.]. – Саратов, 2012. – С. 146–147.*

8. Фармакокинетические свойства фосфолипидных производных флударабина / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Т.Н. Буравская, Е.Н. Калиниченко, М.Б. Голубева, Б.Б. Кузьмицкий // *Белорусские лекарства : материалы Международной научно-практ. конф., Минск, 27–28 ноября 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: С.А. Усанов [и др.]. – Минск, 2014. – С. 227–229.*

Тезисы докладов:

9. **Oleynikova, I.A.** Synthesis and properties of new ribavirin-lipid conjugates / I.A. Oleynikova, T.I. Kulak, E.N. Kalinichenko // *Butlerov Congress : Book of Abstracts of International Congress on Organic Chemistry dedicated to the 150-th anniversary of the Butlerov's Theory of Chemical Structure of Organic*

Compounds, Kazan, 18–23 September 2011 / Kazan (Volga region) Federal University ; ed. : A.E. Arbuzov. – Kazan, 2011. – P. 391.

10. Новые липидные производные противоопухолевого препарата Клофарабин / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко, М.Б. Голубева // Отечественные противоопухолевые препараты : материалы Республиканской научно-практ. конф. с международным участием, Минск, 17 мая 2012 г. / Онкологический журнал. – 2012. – Т. 6, № 2 (22). – С. 22–23.

11. Получение конъюгатов клофарабина (2-хлор-9-(2-дезоксид-2-фтор- β -D-арабинофунозил)аденина) с диацилглицерофосфатами / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко, А.В. Барановский // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов IV Международной научной конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика А.А. Ахрема, Минск, 17–19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2012. – С. 227–228.

12. **Цибульская, И.А.** Синтез диацилглицеротиофосфатного производного клофарабина / И.А. Цибульская, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов IV Международной научной конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика А.А. Ахрема, Минск, 17–19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2012. – С. 229–230.

13. Цитостатический эффект конъюгатов клофарабина с диацилзамещёнными глицерофосфатами на клеточных линиях опухолей человека / М.Б. Голубева, Б.Б. Кузьмицкий, И.А. Контровская, **И.А. Цибульская**, Е.Н. Калиниченко, Т.И. Кулак // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов IV Международной научной конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика А.А. Ахрема, Минск, 17–19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2012. – С. 50–51.

14. Антипролиферативное действие диацилглицерофосфатных производных флударабина на клетки опухолей человека *in vitro* / М.Б. Голубева, Ю.Ю. Саевич, **И.А. Цибульская**, Е.Н. Калиниченко, Б.Б. Кузьмицкий, Т.И. Кулак // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов V Международной научной конф., Минск, 4–6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2014. – С. 60–61.

15. Фармакокинетические свойства фосфолипидного конъюгата клофарабина / **И.А. Цибульская**, Т.Н. Буравская, М.Б. Голубева, Е.Н. Калиниченко, Т.И. Кулак, Б.Б. Кузьмицкий, Ю.Ю. Саевич // Химия, структура и функция биомолекул : сб. материалов V Международной научной конф., Минск, 4–6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2014. – С. 42–43.

16. Фосфолипидные конъюгаты противоопухолевых нуклеозидов / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко, М.Б. Голубева, Б.Б. Кузьмицкий // Отечественные противоопухолевые препараты : материалы Белорусско-Российской научно-практ. конф. с международным участием, Минск, 23–25 мая 2013 г. / Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 88.

17. Synthesis and *in vitro* activity of phospholipid derivatives of Cladribine / **I.A. Tsybulskaya**, T.I. Kulak., E.N. Kalinichenko, M.B. Golubeva, B.B. Kuzmitsky // Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry : Abstracts of 14th Tetrahedron Symposium, Vienna, 25–28 June 2013 / Elsevier; ed.: E.J. Thomas [et al.]. – Vienna, 2013. – P.111.

18. **Tsybulskaya, I.A.** Synthesis of phospholipid prodrugs of anticancer and antiviral nucleosides / I.A. Tsybulskaya, T.I. Kulak., E.N. Kalinichenko // Drug Discovery Conference : Abstracts, Riga, 27–29 August 2015 / Latvian Institute of Organic Synthesis ; ed.: M. Dambrova – Riga, 2015. – P. 153.

Поданные заявки на выдачу патентов РБ:

19. Диацилглицерофосфатные производные 2-хлор-9-(2-дезоксидезокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)аденина, способы их получения и промежуточный продукт для их получения : заявка а20130509 Респ. Беларусь : МПК C07D487/04 (2006.01) / **И.А. Цибульская**, Т.И. Кулак, Е.Н. Калиниченко, М.Б. Голубева, Б.Б. Кузьмицкий ; дата публ.: 19.04.2013.



РЕЗЮМЕ

Цибульская
Илона Александровна

Синтез и биологические свойства липонуклеотидов

Ключевые слова: рибавирин, клофарабин, кладрибин, флударабин, 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфаты, фосфорамидитный подход, фосфонатный подход, конъюгаты, биодоступность, фармакокинетика, энзиматический гидролиз.

Цель работы: получение конъюгатов терапевтически значимых нуклеозидов с 1,2-диацилглицерофосфатами и их 1,3-изомерами и исследование свойств синтезированных липонуклеотидов.

Объекты исследования: нуклеозиды, 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфаты.

Предмет исследования: синтез 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных нуклеозидов.

Методы исследования: современные методы препаративного органического синтеза, 1D и 2D ЯМР-, УФ-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, элементный анализ, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия.

Полученные результаты и их новизна: разработаны эффективные схемы синтеза нуклеозид-диацилглицерофосфатов, заключающиеся в использовании универсальных синтонов на основе фосфорамидитных и Н-фосфонатных производных диацилглицеринов, которые позволили получить новые конъюгаты нуклеозида рибавирина, обладающего противовирусной активностью, и нуклеозидов клофарабина, кладрибина и флударабина, обладающих противоопухолевой активностью, с диацилглицерофосфолипидами.

Обнаружена способность 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатов нуклеозидов гидролизаться с различной скоростью панкреатической ФЛА₂, ФЛД из *Streptomyces sp.* и ФДЭ из *Crotalus durissus*.

Показано, что биологически активные нуклеозиды пролонгированно выделяются из их 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных в сыворотку крови животных, что демонстрирует перспективность полученных конъюгатов в качестве депо-форм составляющих их нуклеозидов.

Область применения: органическая и биоорганическая химия, химия природных соединений, медицина.

SUMMARY

Tsybulskaya
Ilona Alexandrovna

Synthesis and biological properties of liponucleotides

Key words: ribavirin, clofarabine, cladribine, fludarabine, 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphates, phosphoramidite approach, phosphonate approach, conjugates, bioavailability, pharmacokinetic, enzymatic hydrolysis.

The aims of the research: preparation of conjugates of therapeutically significant nucleosides with 1,2-diacylglycerophosphates and their 1,3-isomers and investigation of the properties of the synthesized liponucleotides.

The object of the research: nucleosides, 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphates.

The subject of the research: synthesis of 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphate derivatives of nucleosides.

Methods of investigation: modern methods of preparative organic synthesis, 1D and 2D-NMR-, UV-spectroscopy, high-resolution mass-spectrometry, elemental analysis, HPLC, liquid chromatography mass-spectrometry.

Obtained results and their novelty: the effective schemes of synthesis of nucleoside-diacylglycerophosphates, consisting in the use of the universal synthons based on the phosphoramidite and phosphonate derivatives of diacylglycerols, have been performed. Based on these schemes the conjugates of antiviral nucleoside ribavirin and antitumor nucleosides clofarabine, cladribine, fludarabine have been synthesized. It was found that the phospholipid conjugates of nucleosides were hydrolyzed by phospholipase A₂ from porcine pancreas, phospholipase D from *Streptomyces sp.*, and phosphodiesterase from *Crotalus durissus*. It is shown that administration of 1,2- and 1,3-diacylglycerphosphate conjugates leads to prolonged circulation of nucleosides in animal serum, thus the phospholipid conjugates may be regarded as a depot forms of their constituent nucleosides.

Fields of application: organic and bioorganic chemistry, chemistry of natural compounds, medicine.

РЭЗІЮМЭ

Цыбульская
Ілона Аляксандраўна

Сінтэз і біялагічныя ўласцівасці ліпануклеатыдаў

Ключавыя словы: рыбавірын, клафарабін, кладрыбін, флударабін, 1,2- і 1,3-дыацылгліцэрафасфаты, фасфарамідытны падыход, фасфанатны падыход, кан'югаты, біядаступнасць, фармакакінэтыка, энзіматычны гідроліз.

Мэта працы: атрыманне кан'югатаў тэрапеўтычна значных нуклеазідаў з 1,2-дыацылгліцэрафасфатамі і іх 1,3-ізамерамі і даследаванне уласцівасцяў сінтэзаваных ліпануклеатыдаў.

Аб'екты даследавання: нуклеазіды, 1,2- і 1,3-дыацылгліцэрафасфаты.

Прадмет даследавання: сінтэз 1,2- і 1,3-дыацылгліцэрафасфатных вытворных нуклеазідаў.

Метады даследавання: сучасныя метады прэпаратыўнага арганічнага сінтэзу, 1D і 2D ЯМР-, УФ-спектраскапія, мас-спектраметрыя высокага раздзялення, элементны аналіз, ВЭЖХ, хромата-мас-спектраметрыя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны эфектыўныя схемы сінтэзу нуклеозід-дыацылгліцэрафасфатаў, якія складаюцца ў выкарыстанні універсальных сінтонаў на аснове фасфарамідытных і Н-фасфанатных вытворных дыацылгліцэролаў, якія дазволілі атрымаць новыя кан'югаты нуклеазіда рыбавірына, які валодае супрацьвіруснай актыўнасцю, і нуклеазідаў клафарабіна, кладрыбіна і флударабіна, якія валодаюць проціапухолевой актыўнасцю, з дыацылгліцэрафасфаліпідамі. Выяўленая здольнасць 1,2- і 1,3-дыацылгліцэрафасфатаў нуклеазідаў гідралізавацца з рознай хуткасцю панкрэатычнай ФЛА₂, ФЛД з *Streptomyces sp.* і ФДЭ з *Crotalus durissus*. Паказана, што біялагічна актыўныя нуклеазіды пралангіраванна вылучаюцца з іх 1,2- і 1,3-дыацылгліцэрафасфатных вытворных ў сыворотку крыві жывёл, што дэманструе перспектыўнасць атрыманых кан'югатаў ў якасці дэпо-формаў ўваходзячых у іх склад нуклеазідаў.

Галіна выкарыстання: арганічная і біяарганічнай хімія, хімія прыродных злучэнняў, медыцына.