

# СИНТЕЗ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ 8-БРОМНЕЛАРАБИНА SYNTHESIS AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF 8-BROMONELARABINE

*Е. И. Квасюк<sup>1</sup>, М. А. Ханчевский<sup>2</sup>, Т. Н. Жуковец<sup>3</sup>, А. Г. Сыса<sup>1</sup>*  
*E. Kvasyuk<sup>1</sup>, M. Khancheuski<sup>2</sup>, T. Zhukovets<sup>3</sup>, A. Sysa<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ  
г. Минск, Республика Беларусь  
ekvasyuk@inbox.ru

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Научно исследовательский институт клинической и экспериментальной медицины БГМУ,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>1</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU  
Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, BSMU, Minsk, Republic of Belarus

Описан способ получения 8-бромнеларабина реакцией взаимодействия неларабина с бромной водой. Структура синтезированного соединения подтверждена данными <sup>1</sup>H ЯМР- и УФ-спектроскопии. Изучена антипролиферативная активность неларабина и 8-бромнеларабина в отношении клеток опухолевых культур HepG2, K562 и HL60. Показано, что оба соединения в концентрации 10<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> М обладают умеренной антипролиферативной активностью в отношении клеток исследуемых культур.

The synthesis of 8-bromonelarabine by reaction of nelarabine with bromine water was described. The structure of the synthesized compound was confirmed by <sup>1</sup>H NMR- and UV-spectroscopy. The antiproliferative activity of nelarabine and 8-bromonelarabine against HepG2, K562 and HL60 line tumour cells have been studied. It was determined that both compounds at concentration 10<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> M show moderate antiproliferative activity.

*Ключевые слова:* неларабин, 8-бромнеларабин, синтез, антипролиферативная активность, опухолевые культуры клеток HepG2, K562 и HL60.

*Keywords:* nelarabine, 8-bromonelarabine, synthesis, antiproliferative activity, HepG2, K562 and HL60 tumor cells.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-411-414>

**Введение.** Возникновение резистентности к действию лекарственных препаратов требует их обновления для обеспечения эффективности процесса лечения различных заболеваний. В результате постоянно проводимых научных исследований по поиску биологически активных соединений и появляются препараты нового поколения. Одним из таких соединений является модифицированный нуклеозид 2-амино-6-метокси-9-(β-D-арабинофуранозил)пурин **1**. Это соединение, обладающее противоопухолевой и противовирусной активностью, получило название «неларабин», и пополнило арсенал противолейкозных соединений нового поколения [1–3]. Неларабин относится к антиметаболитам пуринового ряда и является аналогом дезоксигуанозина. По механизму своего действия неларабин можно отнести к про-лекарствам, а его активной формой является продукт дезаминирования – арабинофуранозилгуанин (araG) **2**, который, превращаясь в клетках в соответствующий 5'-трифосфат **3**, ингибирует синтез ДНК, оказывая цитотоксическое действие (рис. 1).

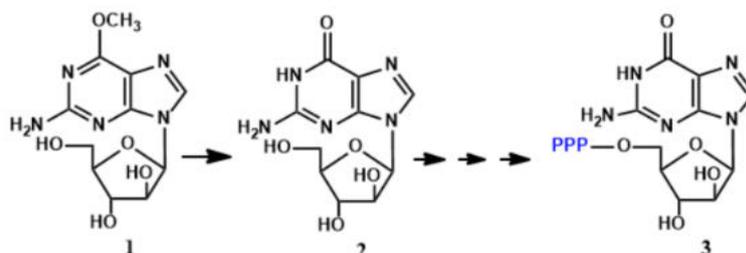


Рисунок 1 – Схема превращения неларабина **1** в 5'-трифосфат арабинофуранозилгуанина **3**

Преимуществом неларабина, как противоопухолевого препарата, в сравнении с araG, является его большая (в ~10 раз) растворимость [2, 3]. К недостаткам следует отнести более сложный синтез соединения. К настоящему времени другие биологические свойства неларабина изучены недостаточно, и их дальнейшее изучение является весьма перспективным.

Довольно давно было замечено, что замена рибозного фрагмента в природных нуклеозидах на арабинофуранозный приводит к появлению у модифицированного нуклеозида противоопухолевой и плив противовирусной активности. Пуриновые гетероциклы природных нуклеозидов (аденозина и гуанозина) в результате химических превращений легко превращаются в их производные, модифицированные по положению 2, 6 или 9. Это позволяет получать большое число антиметаболитов с потенциальной биологической активностью и пригодных для практического применения. К таким соединениям, которые сравнительно недавно стали использоваться в качестве противоопухолевых препаратов, относятся флударабинфосфат **4**, клофарабин **5** и кладрибин **6** (рис. 2) [4].

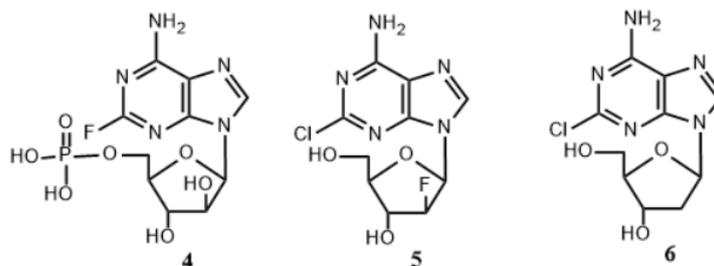


Рисунок 2 – Структурные формулы флударабинфосфата **4**, клофарабина **5** и кладрибина **6**

Галогенированные в гетероосновании нуклеозиды представляют интерес для исследования, так как введение галогена может приводить к соединениям, отличным от природных по своей конформации, что может приводить к новым биологическим свойствам. Наиболее изучены в этом плане оказались бромпроизводные пуриновые нуклеозиды. Введение брома в ряд пуриновых основания приводит к соединениям, обладающим флуоресцентными свойствами [5]. Флуоресцентно меченые нуклеозиды используются в молекулярной биологии, а радиоактивно меченые соединения используются в диагностике онкологических заболеваний. Бромпроизводные пиримидиновых нуклеозидов используются в качестве противовирусных соединений (например, 5-бром-2'-дезоксисуридин [5]). Однако наибольший интерес галоген производные пуринов представляют в качестве промежуточных соединений в синтезе 8-замещённых продуктов с разнообразной биологической активностью, как например, 8-аминопроизводных, которые обладают способностью влиять на транспорт нуклеозидов в клетку [6]. Так как реакция замещения атома брома протекает по механизму нуклеофильного замещения, то это позволяет получать большое число разнообразных производных и изучать их биологические свойства.

С целью сравнительного изучения антипролиферативной активности неларабина и его 8-бромпроизводного araG **2** с помощью ряда последовательных химических трансформаций был превращён в неларабин **1**, который действием раствора брома в воде превращали в 8-бромнеларабин **10**. Структура 8-бромнеларабина подтверждена данными тонкослойной хроматографии, УФ- и <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии. Схема получения бромнеларабина **10** представлена на рисунке 3.

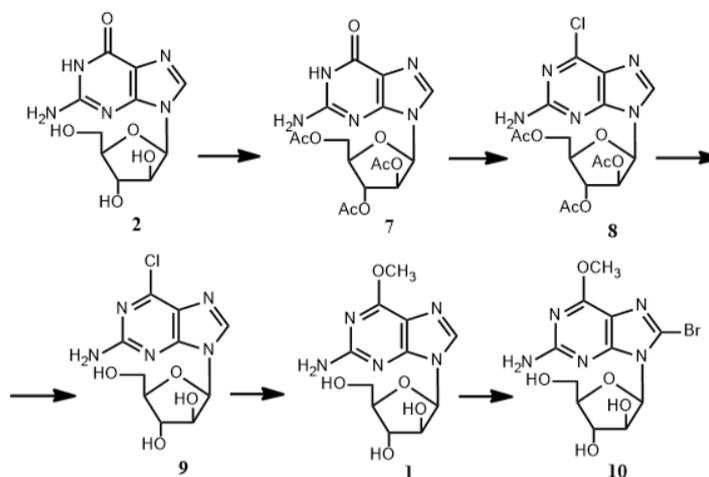


Рисунок 3 – Схема синтеза 8-бромнеларабина **10** из арабинофуранозилгуанина **2**

Арабинозид гуанина **2** обрабатывали уксусным ангидридом в ацетонитриле в присутствии N,N-диметиламинопиридина и триэтиламина в качестве катализаторов реакции. Образовавшийся порошкообразный триацетат araG **7** выделяли с выходом 90%.

Полученный триацетат araG **7** обрабатывали оксихлоридом фосфора в ацетонитриле в присутствии бензилтриэтиламмоний хлористого и N,N-диметиланилина при кратковременном нагревании при 110–120°C. Образующееся в ходе реакции 6-хлорпроизводное триацетата **8** выделяли экстракцией хлороформом после

обработки реакционной смеси холодным раствором бикарбонатом натрия. Упаривание хлороформного раствора в вакууме приводило к соединению **8**, выделенному с выходом 92% в виде аморфного порошка.

Удаление ацетильных групп с соединения **8** проводили с обработкой раствором карбоната калия в метаноле при 50–60°C. После завершения реакции раствор нейтрализовали ионообменной смолой Dowex 50x8 (H<sup>+</sup>-форма). Образующийся в ходе реакции 6-хлорпроизводное **9** выделяли с выходом 70% в виде пенообразного порошка после упаривания метанола и соупаривания остатка с этиловым спиртом.

Замещение атома хлора в положении 6 в соединении **9** проводили обработкой хлорпроизводного **9** раствором метилата натрия в метаноле. Последующие нейтрализация раствора концентрированной соляной кислотой, удалением выпавшего хлорида натрия и колоночной хроматографией на силикагеле получали в кристаллическом виде неларабин **1** с выходом 60%.

К суспензии неларабина **1** в воде при энергичном перемешивании на магнитной мешалке порциями добавляли раствор брома в воде. Контроль за протеканием реакции осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках силикагеля с флуоресцентным индикатором. Смесь перемешивали при комнатной температуре до полного исчезновения исходного неларабина, и избыток брома выдували струёй сжатого воздуха. Для полного обесцвечивания раствора к нему добавляли насыщенный раствор бисульфита натрия. Полученную смесь выдерживали в холодильнике до окончания кристаллизации. Полученные кристаллы отфильтровывали и сушили на воздухе до постоянного веса. Получали 8-бромнеларабин **10** с выходом 63%. Белые кристаллы т. пл. 211–212°C. УФ ( $\lambda_{max}$ , нм): 252, 287. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, T<sub>M</sub>): 6.48 (2H, уш. с., NH<sub>2</sub>); 6.13 (1H, д., C1'-H); 5.62 (1H, д., C2'-OH); 5.39 (1H, д., C3'-OH); 5.00 (1H, т., C5'-OH); 4.37 (1H, д.д., C2'-H); 4.27 (1H, д.д., C3'-H); 3.96 (3H, с., OCH<sub>3</sub>); 3.81–3.69 (3H, м., C4'-H, C5'-H, C5''-H).

Оценка жизнеспособности клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, хронической миелогенной лейкемии человека K562 и промиелоцитарной лейкемии человека HL60 проводили с использованием резазурина. Растворы исследуемых веществ готовили в 1 мл культуральной жидкости (стоковый раствор). После приготовления стокового раствора далее его разбавляли до необходимых концентраций.

Принцип работы индикатора резазурина основан на способности жизнеспособных клеток восстанавливать резазурин в резорурфин, который, в отличие от резазурина, обладает флуоресцентными свойствами. Интенсивность флуоресценции резорурфина пропорциональна количеству жизнеспособных клеток, что позволяет оценивать ингибирующую способность исследуемых соединений на пролиферацию клеток. Процесс восстановления резазурина до резорурфина происходит за счет активности клеточных окислительно-восстановительных ферментов, интенсивность работы которых прямо пропорциональна активности и жизнеспособности клеток (рис. 4).

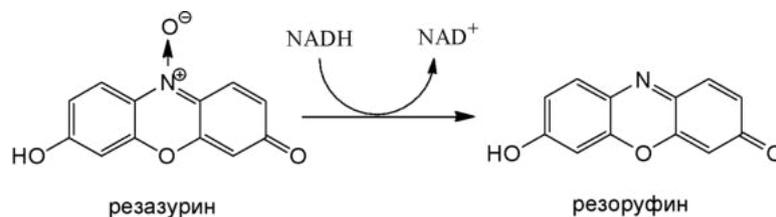


Рисунок 4 – Схема восстановления резазурина до резорурфина

Снижение концентрации (окисление) резорурфина свидетельствует о нарушениях в митохондриях и, как следствие, снижении жизнеспособности клеток. Оценку эффективности действия соединений проводили в 96-луночном плоскодонном планшете. В лунки, содержащие клетки HepG2, K562 и HL60 вносили исследуемые соединения в различной концентрации и добавляли по 20 мкл раствора резазурина. Смесь инкубировали в течении 3 часов при 37 °C в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub>. Измерения интенсивности флуоресценции проводили на мультипланшетном ридере CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Метод детекции — флуориметрический, (длина волны возбуждения 530 нм; длина волны эмиссии 590 нм. Регистрация результатов проводилась через 48 часов после внесения субстанций.

Суммарные результаты изменения интенсивности флуоресценции резорурфина в образцах клеточных культур в присутствии неларабина и 8-бромнеларабина в концентрациях 10<sup>-7</sup>–10<sup>-3</sup> Моль представлены в таблицах 1–3. Результаты, полученные в контроле (без добавления исследуемых соединений), принимали за 100% выживаемость клеток.

Таблица 1

*Интенсивность флуоресценции испытуемых и контрольных образцов в клеточной культуре гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2*

концентрация соединения в лунке, Моль	неларабин	8-бромнеларабин	контроль
10 <sup>-3</sup>	13969	20125	23657
10 <sup>-4</sup>	20592	22212	23657
10 <sup>-5</sup>	23287	23866	23657
10 <sup>-6</sup>	24205	24307	23657
10 <sup>-7</sup>	23821	24206	23657

Таблица 2

*Интенсивность флуоресценции испытуемых и контрольных образцов в клеточной культуре хронической миелогенной лейкемии человека K562*

концентрация соединения в лунке, Моль	неларабин	8-бромнеларабин	контроль
10 <sup>-3</sup>	10263	11271	20908
10 <sup>-4</sup>	17100	14760	20908
10 <sup>-5</sup>	20204	18172	20908
10 <sup>-6</sup>	20294	20998	20908
10 <sup>-7</sup>	21096	19234	20908

Таблица 3

*Интенсивность флуоресценции испытуемых и контрольных образцов в клеточной культуре промиелоцитарной лейкемии человека HL60*

Концентрация соединения в лунке, Моль	неларабин	8-бромнеларабин	контроль
10 <sup>-3</sup>	3042	3282	7406
10 <sup>-4</sup>	5894	6156	7406
10 <sup>-5</sup>	7645	7372	7406
10 <sup>-6</sup>	7971	7198	7406
10 <sup>-7</sup>	7246	7605	7406

Как следует из полученных результатов антипролиферативная активность неларабина и 8-бромнеларабина проявляется лишь при концентрациях 10<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> Моль, что свидетельствует об устойчивости исследуемых клеток к соединениям при их действии в низких концентрациях. Существенных отличий в активности неларабина и его 8-бромпроизводного в данных условиях не наблюдается.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 6-Methoxypurine arabinoside as a selective and potent inhibitors of varicella-zoster virus / D. V. Averett [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35, № 5. – P. 851–857.
2. 2-Amino-6-methoxypurine arabinoside: an agent for T-cell malignancies / C. U. Lambe [et al.] // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 3352–3356.
3. Nelarabine: a novel purine antimetabolite antineoplastic agent / L. W. Buie [et al.] // *Clinical Therapeutics.* – 2007. – Vol. 29, № 9. – P. 1887–1899.
4. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs / J. Shelton [et al.] // *Chem. Rev.* – 2016. – Vol. 116. – P. 14379–14455.
5. Facile Access to Bromonucleosides Using Sodium Monobromoisocyanurate (SMBI) / J. Maity [et al.] // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* – 2017. – Supl. 68. – P. 1.39.1–1.39.9.
6. Identification of 8-Aminoadenosine Derivatives as a New Class of Human Concentrative Nucleoside Transporter 2 Inhibitors / K. Tatani [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 244–248.