

На правах рукописи

СОЛЬЕВ Павел Николаевич

**СОЗДАНИЕ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ И
ДРУГИХ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ
НУКЛЕОЗИДОВ И ИХ ДЕПО ФОРМ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

НАУЧНЫЙ
РУКОВОДИТЕЛЬ:

Куханова Марина Константиновна

доктор биологических наук,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

ОФИЦИАЛЬНЫЕ
ОППОНЕНТЫ:

Формановский Андрей Альфредович

доктор химических наук, профессор,
заведующий Лабораторией органического синтеза
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиком М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Каплун Александр Петрович

доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник кафедры биотехнологии
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский
технологический университет (МИТХТ)»

ВЕДУЩАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской
академии наук. 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 47,
(499) 137-29-44

Защита диссертации состоится «___»_____2016 г. в ___ часов на заседании диссертационного Совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32) и на сайте <http://www.eimb.ru>.

Автореферат разослан «___»_____2016 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук

А.М. Крицын

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Аналоги нуклеозидов/нуклеотидов широко используются в клинике для лечения социально значимых заболеваний, вызванных такими опасными вирусами, как вирус иммунодефицита человека, вирусы герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирус, и другие. Нуклеозидные и нуклеотидные аналоги – это синтетические химически модифицированные соединения, миметики природных нуклеозидов, которые в результате структурных биотрансформаций в клетке встраиваются в ДНК или РНК и ингибируют вирусную репликацию или клеточное деление. Помимо встраивания в нуклеиновые кислоты, они могут взаимодействовать и ингибировать важные ферменты метаболизма нуклеиновых кислот, такие как нуклеотидполимеразы вирусов и человека, киназы, рибонуклеотидредуктазы, ДНК-метилтрансферазы, пуриновые или пиримидиновые нуклеозидфосфорилазы и другие.

Для более эффективного подавления многих вирусных заболеваний, в частности, ВИЧ-инфекции, применяется комбинированная терапия – одновременное использование нескольких типов препаратов, направленных на разные вирусные мишени. ВИЧ-инфицированные больные часто ко-инфицированы другими вирусами, например, более 80% из них страдают от сопутствующего вируса герпеса. Проводятся поиски соединений, одновременно подавляющих несколько типов вирусов, возможностей улучшения свойств уже применяемых лекарств: снижения их токсичности для неинфицированных клеток и уменьшения кратности приёма, а также изучение эффектов аддитивности и синергизма препаратов. За последние десятилетия были созданы эффективные противовирусные препараты на основе аналогов нуклеозидов, ставшие основой высокоактивной антиретровирусной терапии. В организме они проходят каскад фосфорилирования клеточными киназами до трифосфатов, которые являются субстратами обратной транскриптазы ВИЧ, встраиваются в растущую цепь ДНК и терминируют репликацию вируса. Биологическая активность таких соединений зависит в значительной степени от структуры и конформации сахарного фрагмента. Против некоторых типов вирусов получили распространение ациклические производные нуклеозидов и нуклеотидов с измененными фрагментами рибозного цикла, которые, в основном, имеют схожий с рибозосодержащими нуклеозидами механизм действия на полимеразы вирусов. Обладая отличными от природных конформаций диэдральными углами и степенями свободы, ациклические нуклеозидные аналоги могут проявить бóльший спектр

активности против нескольких типов вирусов, а введение фосфонатного остатка позволяет имитировать фосфат нуклеотида и не нуждаться в первой (обычно лимитирующей) стадии фосфорилирования, оставаясь стабильным в биологических средах.

Тем не менее, многим из применяемых препаратов присущи недостатки, такие как плохая растворимость, токсические побочные эффекты при длительном использовании препаратов, а также неизбежное возникновение резистентных к ним штаммов вируса, что приводит к значительному снижению эффективности имеющихся лекарственных средств. Одним из способов решения этих проблем является синтез биodeградируемой депо-формы лекарственных препаратов. В качестве удачных примеров можно назвать анти-ВИЧ препарат тенофовир дизопроксил фумарат (Viread™), являющийся депо-формой ациклического аналога аденозина, а также 5'-Н-фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина – фосфазад (Никавир®) – первый отечественный анти-ВИЧ препарат, созданный в нашей лаборатории. Их применение позволило снизить побочные эффекты исходных нуклеозидов, продлить время нахождения в организме и уменьшить кратность приёма в сутки. Таким образом, синтез новых ациклических фосфонатных производных нуклеозидов и создание различных депо форм ингибиторов репликации вирусов считается перспективным направлением развития антивирусной терапии.

Настоящая работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ИМБ РАН по поиску прототипов лекарственных средств с антивирусной активностью (программа «Молекулярная и клеточная биология») и при финансовой поддержке грантов РФФИ (12-04-00581-а и 14-04-31163-мол_а).

Целью работы было создание ингибиторов репликации ВИЧ и других сопутствующих ему вирусов на основе ациклических фосфонатных нуклеозидов и депо-форм нуклеозидных аналогов.

Задачами работы являлись 1) синтез новых карбаматных и фосфонатных депо-форм известных анти-ВИЧ препаратов зидовудина (3'-азидо-3'-дезокситимидина, AZT) и ламивудина (L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина, 3ТС) и изучение их антивирусной активности и токсичности на клетках, а также отдельных соединений на животных моделях; 2) разработка схем синтеза и получение новых ациклических фосфонатных производных аденина и гуанина, содержащих оксимный фрагмент в цепи, изучение их антивирусной активности в культурах клеток, инфицированных

ВИЧ, вирусами герпеса и гепатита С, определение токсичности соединений на неинфицированной культуре клеток.

Научная новизна. Предложены методы синтеза новых карбаматных и бис-нуклеозидфосфонатных производных и осуществлен их синтез. При этом впервые получен смешанный бис-нуклеозидфосфонат AZT и ЗТС, содержащий при одном фосфонатном остатке два различных нуклеозидных аналога с анти-ВИЧ активностью. Разработана методика получения фосфонатных ациклических аналогов нуклеотидов с оксимным фрагментом в цепи, предложены оптимизация синтеза, детекция и очистка соединений для повышения выхода целевых продуктов.

Практическая ценность. Данная диссертационная работа расширяет опыт синтеза пролекарственных препаратов на основе нуклеозидных аналогов и даёт достаточно полное представление о фармакокинетических характеристиках новых фосфонатных и карбаматных производных известных анти-ВИЧ препаратов. Синтез ациклических нуклеотидных аналогов обычно индивидуален для каждого отдельного типа структуры, однако предложенный в работе подход обладает универсальностью и позволяет не только в дальнейшем расширять ряд оксимных производных, изменяя заместители боковой цепи, но и использовать ключевой интермедиат для функционализации фосфонатным остатком любого карбонил-содержащего производного через “click”-реакцию синтеза оксимов. Выход интермедиата удалось повысить вдвое по сравнению с описанными методиками его синтеза, а также выявить новые способы детекции *O*-замещенных гидроксилламинов.

Степень достоверности и апробация работы. Строение и чистота полученных соединений подтверждены данными ^1H , ^{13}C , ^{31}P и ^{15}N ЯМР спектроскопии, в том числе с использованием методов 2D (COSY, HSQC и HMBC) ЯМР, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения

Основные положения диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry «MedChem-2015» (г. Новосибирск, 2015), 28th International Conference on Antiviral Research «ICAR-2015» (Италия, г. Рим, 2015), Innovative Approaches for Identification of Antiviral Agents Summer School «2nd IAAASS» (Италия, Санта Маргерита ди Пула, 2014), 15th Tetrahedron Symposium – Challenges in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry (Великобритания, г. Лондон, 2014), Первая Российская конференция по медицинской химии «MedChem Russia» с международным участием (г. Москва,

2014), Congress of the Federation of European Biochemical Societies – Mechanisms in Biology «38th FEBS» (г. Санкт-Петербург, 2013), Весенний и осенний финалы по программе «У.М.Н.И.К.» РАН (г. Москва, 2012), IV Всероссийский научно-практический семинар молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (г. Волгоград, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в реферируемых журналах, 9 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций и получен один патент Российской Федерации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 128 страницах и состоит из 8 частей: Введения, Литературного обзора (посвященного методам синтеза нуклеозидных/нуклеотидных аналогов и их производных, а также основным механизмам воздействия на вирусы), Обсуждения результатов, Выводов, Экспериментальной части, Списка литературы, Благодарностей и Приложения. Список цитируемой литературы состоит из 258 наименований.

В литературном обзоре представленной диссертации дан краткий исторический экскурс в историю создания нуклеозидных и нуклеотидных аналогов противовирусной терапии (и отдельно анти-ВИЧ препаратам), включая их наиболее актуальные депо-формы, их применение при терапии заболеваний. Отмечаются также недостатки уже существующих лекарственных форм и возможности их улучшения.

Экспериментальная часть работы посвящена синтезу новых ациклических фосфонатных аналогов нуклеозидов, содержащих оксимный фрагмент в структуре – ингибиторов репликации ВИЧ и вируса герпеса 1 типа, а также синтезу новых низкотоксичных депо-форм известных анти-ВИЧ нуклеозидных аналогов. Задачей работы являлось изучение новых структурных типов производных для расширения ряда противовирусных соединений и вывод о перспективности полученных соединений для дальнейших преклинических исследований. Разработаны схемы синтеза, получены и охарактеризованы соединения, изучена стабильность, антивирусная активность и токсичность в культурах клеток.

Работа выполнена в лаборатории Молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез фосфонатных производных нуклеозидов. Н-Фосфонат ЗТС

Одним из основных нуклеозидов в комбинированной терапии ВИЧ является L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС). Мы решили исследовать его Н-фосфонат, являющийся депо-формой нуклеозида, для улучшения фармакокинетики. Синтез Н-фосфоната ЗТС (**1a**) проводился по аналогии с ранее изученными фосфонатными производными нуклеозидов – реакцией с фосфористой кислотой под действием дициклогексилкарбодиимида согласно классической методике синтеза такого типа производных.

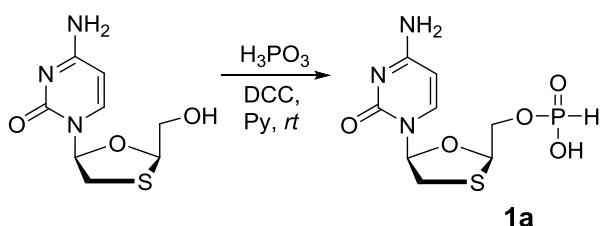


Рис. 1. Синтез Н-фосфоната ЗТС.

Соединение было исследовано в НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского как ингибитор репликации ВИЧ-1 на клетках МТ-4. Хотя эффективность подавления репликации **1a** была в 10 раз ниже активности исходного препарата ЗТС, цитотоксичность Н-фосфоната была снижена почти на два порядка, и, как результат, его индекс селективности был повышен на порядок по сравнению с ЗТС (Таблица 1).

Таблица 1. Анти-ВИЧ активность Н-фосфоната ЗТС в клетках линии МТ-4

	Соединение	EC ₅₀ [*] , μМ	CC ₅₀ [†] , μМ	SI [‡]
1a	Н-Р(О)(ОН)(ЗТС)	3,4	>3410	>1000
	ЗТС	0,44	43,6	100

Мы изучили химическую стабильность **1a** и стабильность в цельной крови собаки. Время гидролиза половинного количества T_{1/2} в растворах рН 5,5-8,5 было значительно больше 24 ч, однако фосфонат претерпевает гидролиз после перорального введения животным с высвобождением ЗТС.

Изучение фармакокинетики **1a** в сравнении с ЗТС на животных было проведено совместно с фармацевтической фирмой ЗАО «Ассоциация АЗТ» (Таблица 2).

* EC₅₀ – эффективная концентрация, ингибирующая размножение вируса на 50%

† CC₅₀ – цитотоксическая концентрация, при которой уменьшается количество клеток на 50%

‡ SI – индекс селективности, отношение CC₅₀ / EC₅₀

Таблица 2. Фармакокинетические параметры Н-фосфоната ЗТС
на животных моделях

Модель	Вещество	C_{\max} (мг/л)	T_{\max} (ч)	AUC_{0-24} (мг/л × ч)	$T_{1/2}$ (ч)
кролик [*]	ЗТС из 1a	$2,71 \pm 0,41$	3	$15,96 \pm 2,54$	$3,14 \pm 0,29$
	ЗТС	$9,47 \pm 1,74$	1	$30,62 \pm 7,46$	$5,83 \pm 0,24$
собака [†]	ЗТС из 1a	$2,85 \pm 0,30$	$2,5 \pm 0,5$	$20,60 \pm 3,80$	$5,31 \pm 1,06$
	ЗТС	$5,17 \pm 0,50$	1,5	$28,99 \pm 5,03$	$4,57 \pm 0,82$

Показано, что время гидролиза половинного количества ($T_{1/2}$) соединения **1a** в крови собаки после перорального применения составило 5 ч, а в кроликах после внутрибрюшинного введения – менее 4 ч. В качестве единственного метаболита по ВЭЖХ анализу детектирован лишь ЗТС. Таким образом, Н-фосфонат ЗТС **1a** является депо формой ЗТС. Как видно из Рис. 2, наблюдается снижение максимальной концентрации высвобожденного ЗТС в крови по сравнению с приёмом самого ЗТС в той же дозировке, при том же времени пребывания в организме и более пологой кривой нарастания концентрации ЗТС от времени.

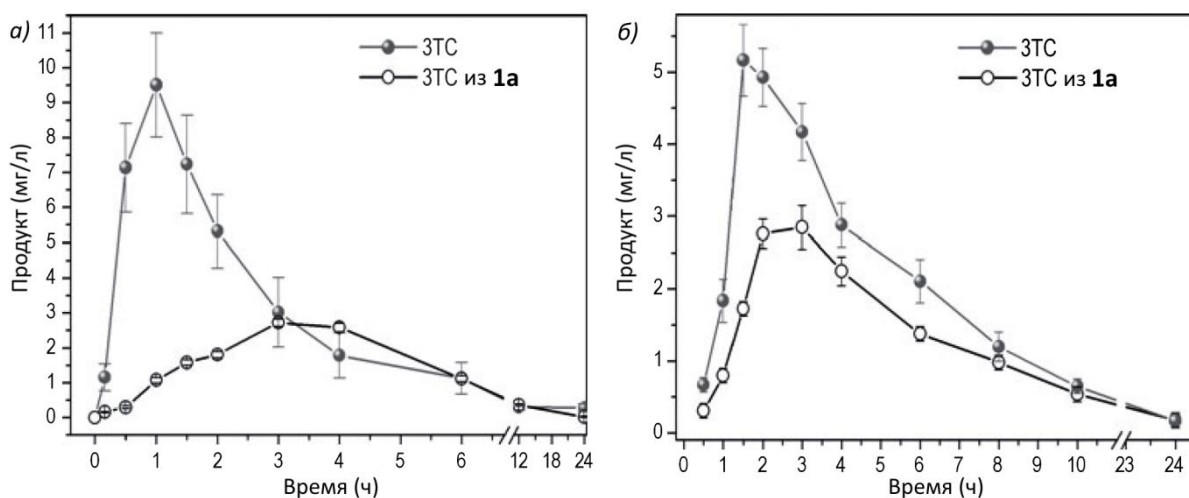


Рис. 2. Зависимость концентрации ЗТС от времени в крови: а) кролика^{*}; б) собаки[†].

2. Синтез фосфонатных производных нуклеозидов. Бис-нуклеозидные фосфонаты

Димеры аналогов нуклеозидов представляют особой интерес в виду возможности комбинации двух анти-ВИЧ препаратов в одной молекуле. Нами были

^{*} Данные получены из отобранных образцов крови кролика после однократного внутрибрюшинного введения **1a** в дозе 80 мг/кг веса

[†] Данные получены из отобранных образцов крови собаки после однократного перорального приема **1a** в дозе 12 мг/кг веса

выбраны наиболее эффективные анти-ВИЧ нуклеозидные аналоги ЗТС и AZT (3'-азидо-3'-дезокситимидин), была оптимизирована методика получения бис-нуклеозид фосфонатов и синтезированы несколько фосфонатных производных как гомодимеров, так и гетеродимеров. Ранее были описаны лишь несколько примеров таких производных.

Были применены три варианта синтеза (Рис. 3): 1) постадийной конденсацией нуклеозида с доступными или синтезированными фосфовыми кислотами под действием дициклогексилкарбодиимида (DCC), и дальнейшее замещение на второй нуклеозид под действием 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPS-Cl) (позволяет получить как гомо-, так и гетеродимеры); 2) конденсацией нуклеозидов с дихлорангидридом фосфоновой кислоты и получением гомодимера в одну стадию (позволяет избежать потерь продукта при хроматографической очистке промежуточного моно-AZT фосфоната); 3) синтез тозилосиметилфосфоната AZT **1b** и далее нуклеофильное замещение тозилата на другие группы, например, на иодид или азид (позволяет произвести функционализацию метилфосфонатного фрагмента).

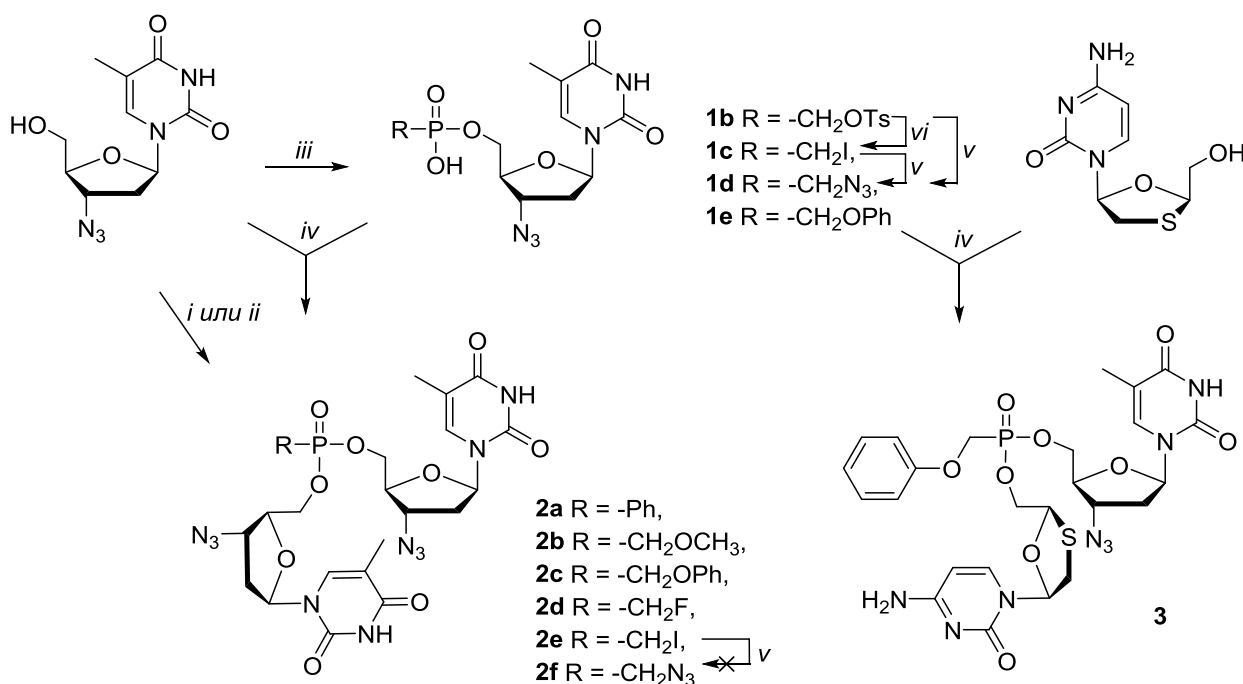


Рис. 3. Синтез бис-нуклеозидных фосфонатных производных. Условия: *i* - RP(O)Cl₂, PO(OEt)₃, 5°C, 18 ч; *ii* - RP(O)(OH)₂, TPS-Cl, Py, 18 ч; *iii* - RP(O)(OH)₂, DCC, Py, 10 ч; *iv* - ЗТС или AZT, TPS-Cl, Py, 18 ч; *v* - NaN₃, DMF, 12 ч, *vi* – KI, DMF, 12 ч.

Синтез через тозилосиметилфосфонат **1b** оказался единственно верным при получении производного **2f**, т.к. замещение иодида не происходит на бис-

нуклеозидном производном из-за пространственного затруднения к S_N2 атаке, и в ходе реакции разлагается фосфодиэфирная связь с AZT.

В ходе синтеза гетеродимера AZT и ЗТС на второй стадии образуются примесные количества 4-НН-фосфоната, т.к. аминогруппа цитидинового основания также участвует в реакции. Продукт 4-НН-замещения был отделен от целевого колоночной хроматографией на силикагеле, но оказался мало стабилен при стоянии в течение недели. Защита аминогруппы ЗТС в реакции с фосфонатом **1e** была исключена, т.к. последующее деблокирование вело бы к гидролизу фосфодиэфирной связи.

Антивирусная активность и цитотоксичность веществ были исследована в НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского (Таблица 3). Производное **2d** оказалось самым активным из ряда и превышало активность AZT в 2 раза, а препарата Никавир[®] – в 8 раз. Смешанный AZT-ЗТС фосфонат **3** не показал существенных преимуществ перед AZT и ЗТС. Активность остальных бис-нуклеозидных производных не превышала данных по AZT, в тестируемой культуре клеток синтезированные соединения показали большую токсичность по сравнению с исходным нуклеозидом. Соединение **2d** было примерно в 5 и 6 раз более токсично, чем AZT и Никавир[®], и, таким образом, его индекс селективности был вдвое ниже, чем для AZT.

Таблица 3. Анти-ВИЧ активность гомо- и гетеродимеров в клетках линии СЕМ-SS

	Соединение	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	SI
2a	Ph-P(O)(AZT) ₂	10	33	3,3
2b	CH ₃ OCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	0,68	31	46
2c	PhOCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	0,25	37	110
2d	FCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	0,015	>25	>1724
2e	ICH ₂ -P(O)(AZT) ₂	>10	>25	2,5
2f	N ₃ CH ₂ -P(O)(AZT) ₂	0,18	24,5	136
3	PhOCH ₂ -P(O)(AZT)(ЗТС)	0,24	60	250
	AZT	0,037	142	3837
	Никавир [®]	0,131	185	1405

Все синтезированные соединения из классов **2** и **3** оказались химически стабильны более чем 24 ч в интервалах pH 4,5-7.

Гидролиз депо-форм в плазме крови зависит от ферментов, таких как, например, 5'-нуклеотидазы. Гидролиз бис-AZT фосфонатов **2** в плазме крови

приводил к смеси AZT и моно-AZT фосфонатов, в то время как для смешанного фосфоната **3** наблюдалась смесь четырёх продуктов: AZT и моно-ЗТС фосфоната, ЗТС и моно-AZT фосфоната. Продукты разделяли и идентифицировали с помощью ВЭЖХ (Рис. 4).

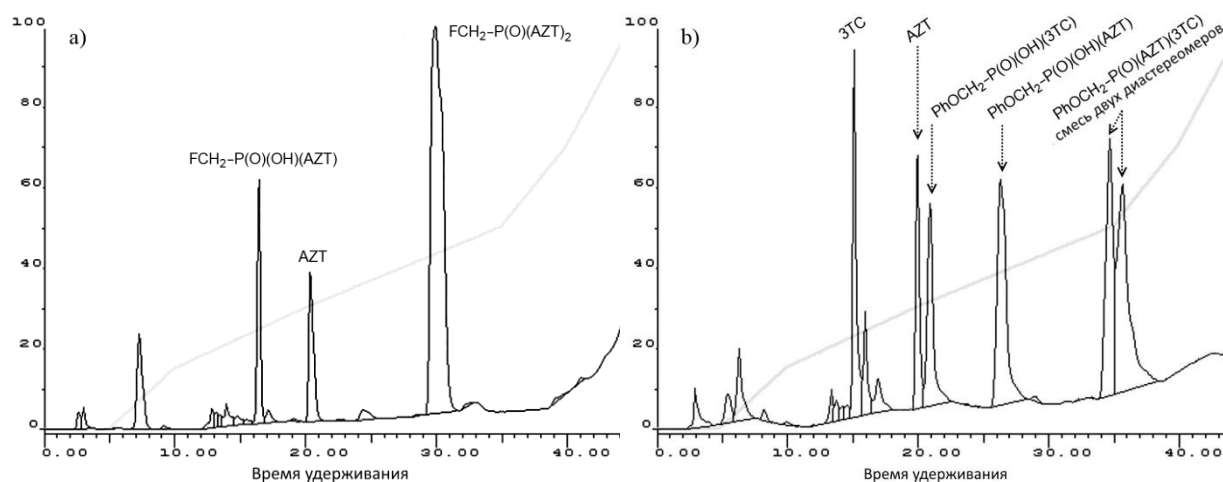


Рис. 4. Разделение на ВЭЖХ продуктов гидролиза в плазме крови человека: а) **2d** – 50 мин после начала гидролиза и б) **3** – 12 ч после начала гидролиза.

Гидролиз половинного количества бис-нуклеозид фосфонатов ($T_{1/2}$) определяли согласно интегралам пиков при различном времени гидролиза (Таблица 4).

Таблица 4. Стабильность соединений в плазме крови человека

	Соединение	$T_{1/2}$, ч	Гидролиз через 24ч *
2a	Ph-P(O)(AZT) ₂	>24	12%
2b	CH ₃ OCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	>24	40%
2c	PhOCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	>24	19%
2d	FCH ₂ -P(O)(AZT) ₂	0,78	100%
2e	ICH ₂ -P(O)(AZT) ₂	>24	18%
2f	N ₃ CH ₂ -P(O)(AZT) ₂	12	75%
3	PhOCH ₂ -P(O)(AZT)(ЗТС)	21	56%
	Никавир [®]	6	100%

Можно заметить, что стерическое затруднение заместителя при фосфонате влияет на скорость гидролиза, который протекает через пятикоординированное переходное состояние фосфора.

Таким образом, были синтезированы новые фосфонатные производные с различными заместителями, содержащие два нуклеозидных остатка в одной

* Данные по гидролизу получены Карпенко И.Л.

молекуле. Их противовирусная активность в клеточных культурах, измеренные уровни скорости и продукты гидролиза подтверждают, что они работают как депо-формы.

3. Синтез карбаматных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина

Нами был получен ряд карбаматных депо-форм AZT для исследования зависимости активности и стабильности от размера заместителя и изучения данного типа производных *in vivo*.

Синтез проводился с помощью реагента Штааба с последующей обработкой соответствующими аминами (Рис. 5), продукты выделяли колоночной хроматографией на силикагеле.

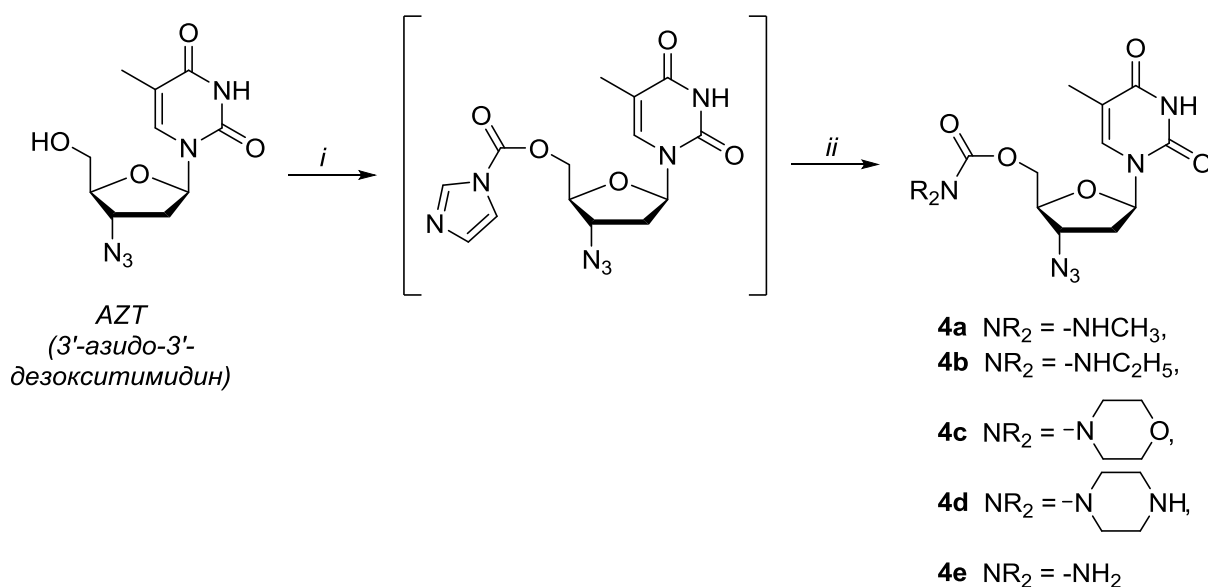


Рис. 5. Синтез карбаматов AZT. Условия: *i* – CDI, DMF, 18°C, 3ч; *ii* – HNR_2 , 18 ч.

Антивирусная активность и цитотоксичность веществ были исследована в НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского (Таблица 5). Самую высокую активность среди синтезированных карбаматов проявил незамещенный карбамат AZT **4e**. В связи с очень низкой токсичностью, не удалось получить точных данных по CC_{50} из-за ограничения в растворимости препарата. В связи с этим значения индекса селективности карбаматных производных в реальности могут оказаться достаточно высокими.

Все синтезированные депо-формы обладают высокой стабильностью в условиях химического гидролиза и гидролиза в плазме крови ($T_{1/2} \gg 24\text{ч}$).

Таблица 5. Анти-ВИЧ свойства карбаматных производных в клетках MT-4

	Соединение	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	SI
4a	CH ₃ -NHC(O)(AZT)	50	>6000	>120
4b	C ₂ H ₅ -NHC(O)(AZT)	45	>6000	>133
4c	OC ₄ H ₈ N-C(O)(AZT)	35	>6000	>171
4d	HNC ₄ H ₈ N-C(O)(AZT)	20	>6000	>300
4e	NH ₂ C(O)(AZT)	3,2	>6000	>1875
	AZT	0,037	80	2300
	Фосфазид (Никавир [®])	0,29	648	2240

Проведено исследование одного из карбаматных производных на животных моделях совместно с ЗАО «Ассоциация AZT». По результатам фармакокинетических исследований после перорального введения собаке морфолинокарбамат **4c** успешно высвобождал AZT в концентрации вдвое меньшей, чем Никавир[®], а также детектировался в исходном виде (в отличие от быстро деградирующего Никавира[®]). При этом время достижения максимальной концентрации AZT увеличилось; сам процесс гидролиза карбамата с высвобождением AZT начинается спустя 6 ч и длится в два раза дольше, чем нахождение нуклеозида при приёме AZT без депо-формы; всасывание же перорально принятого AZT без депо-формы через 6 ч уже проходит на 75%, (Таблица 6). Этот результат позволяет предложить приём подобных карбаматных депо-форм, и **4c** в частности, в сочетании с AZT, что позволит увеличить время нахождения действующего аналога при концентрациях, достаточных для подавления репликации ВИЧ *in vivo*.

Таблица 6. Фармакокинетические параметры **4c**, AZT и фосфазиды

Модель	Вещество	C _{max} (мг/л)	T _{max} (ч)	AUC ₀₋₂₄ (мг/л × ч)	T _{1/2} (ч)
собака [*]	4c	20,12 ± 2,80	3,0	114,60 ± 18,84	3,31 ± 0,04
	AZT из 4c	1,07 ± 0,16	8,0	7,76 ± 1,55	4,41 ± 0,56
собака [†]	AZT из фосфазиды	1,9	4,0	16,6	7,2
	AZT	9,8	2,5	58,8	5,2

Кроме того, AZT, образовавшийся в результате гидролиза **4c**, детектировался в крови даже после 24 ч после приёма **4c**, в то время как при приёме самого AZT он

* Данные получены из отобранных образцов крови собаки после однократного перорального приема **4c** в дозе 60 мг/кг веса.

† Данные получены из отобранных образцов крови собаки после однократного перорального приема Никавира в дозе 70 мг/кг веса.

полностью выводится из организма спустя 12 ч; время достижения максимальной концентрации было в три раза большим, чем у AZT, и в два раза большим, чем у Никавира.

При испытании острой токсичности не удалось достичь LD_{16}^* в исследованиях на мышах для производного **4c** при внутривенной дозе, равной 7,1 г/кг, в то время как этот же важный параметр для AZT и Н-фосфоната AZT составляет 1,3 и 2,0 г/кг, соответственно. Дальнейшее увеличение дозы было проблематичным из-за ограничения в растворимости **4c** в воде.

Таким образом, депо-формы нуклеозидных аналогов позволяют значительно изменить фармакокинетические характеристики применяемых лекарств, а именно, снизить токсичность, обеспечить более равномерную по времени концентрацию препарата в крови и увеличить время жизни активного вещества в организме.

4. Синтез ациклических нуклеозид-фосфонатных производных, содержащих оксимный фрагмент в цепи

В рамках поиска веществ, способных одновременно проявлять активность против нескольких типов вирусов человека, нами был разработан синтез новых фосфонатных производных аденина, содержащих фрагменты оксимов в ациклической цепи.

Ключевые соединения были получены в условиях модифицированной нами реакции Мицунобу, гидразинолиза и последующей “click”-реакцией для формирования оксима. Реакция Мицунобу проводилась в стандартных условиях, в ТГФ при охлаждении на ледяной бане с использованием диэтил гидроксиметилфосфоната в качестве исходного компонента (Рис. 6). Удалось подобрать оптимальные условия, при которых образующийся диизопропил гидразиндикарбоксилат был количественно экстрагирован в системе хлороформ/вода в водный слой, а трифенилфосфиноксид – кристаллизован из гексана или CCl_4 при охлаждении ниже $0^\circ C$, оставляя, таким образом, чистый продукт в органическом растворителе. Далее продукт, диэтил *N*-фталимидилоксиметилфосфонат **5a**, был обработан гидратом гидразина по реакции Инга-Манске и получен диэтил аминоксиметилфосфонат **5b**.

* LD_{16} – средняя доза вещества, вызывающая гибель 16% особей в испытуемой группе.

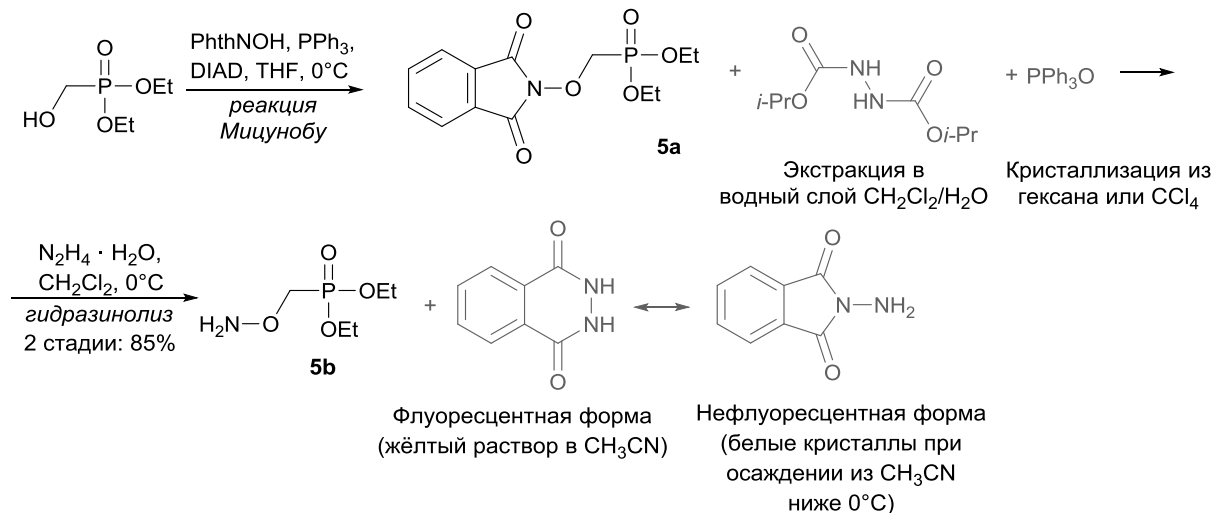


Рис. 6. Синтез диэтил аминоксиметилфосфоната.

При этом в качестве второго продукта образовывался ярко-жёлтый фталевый гидразид, способный к превращению при низких температурах в *N*-аминофталимид, количественно осаждаемый в виде бесцветных кристаллов из ацетонитрила при охлаждении ниже 0°C . Таким образом, основной промежуточный продукт, необходимый для синтеза оксимов, диэтил аминоксиметилфосфонат **5b**, был получен нами с выходом 85% в две стадии без хроматографии, деблокирования эфиров и перегонки. Данный подход позволил увеличить выход вдвое по сравнению с ранее описанным синтезом (А.-М. Lacoste, С. Dumora, J. Zoń // *J. Enzyme Inhibition.* – 1993. – V. 7. – pp. 231-248).

В качестве возможных способов детекции диэтил аминоксиметилфосфоната **5b** нами предложены известные, но не описанные для данного типа соединений проявители. Известно, что нингидрин образует яркий пурпур Руэманна при нагревании с аминами, а также жёлтое окрашивание с гидразином и бесцветное с гидроксиламином. Ранее в литературе или патентах не было описано окрашивание растворами нингидрина при нагревании с аминокси-производными от белого до бледно-жёлтого цвета, который можно соотнести с образованием оксимов нингидрина. Помимо этого нами применялся реактив Драгедорффа, образующий красно-коричневые комплексы $\text{RONH}_3^+[\text{BiI}_4]^-$ и, в отличие от нингидрина, проявляющий также и конечные продукты синтеза – оксимы.

Следующей задачей было проведение последовательного синтеза (9-аденил)-ацетальдегида и его гуанинового аналога (Рис. 7).

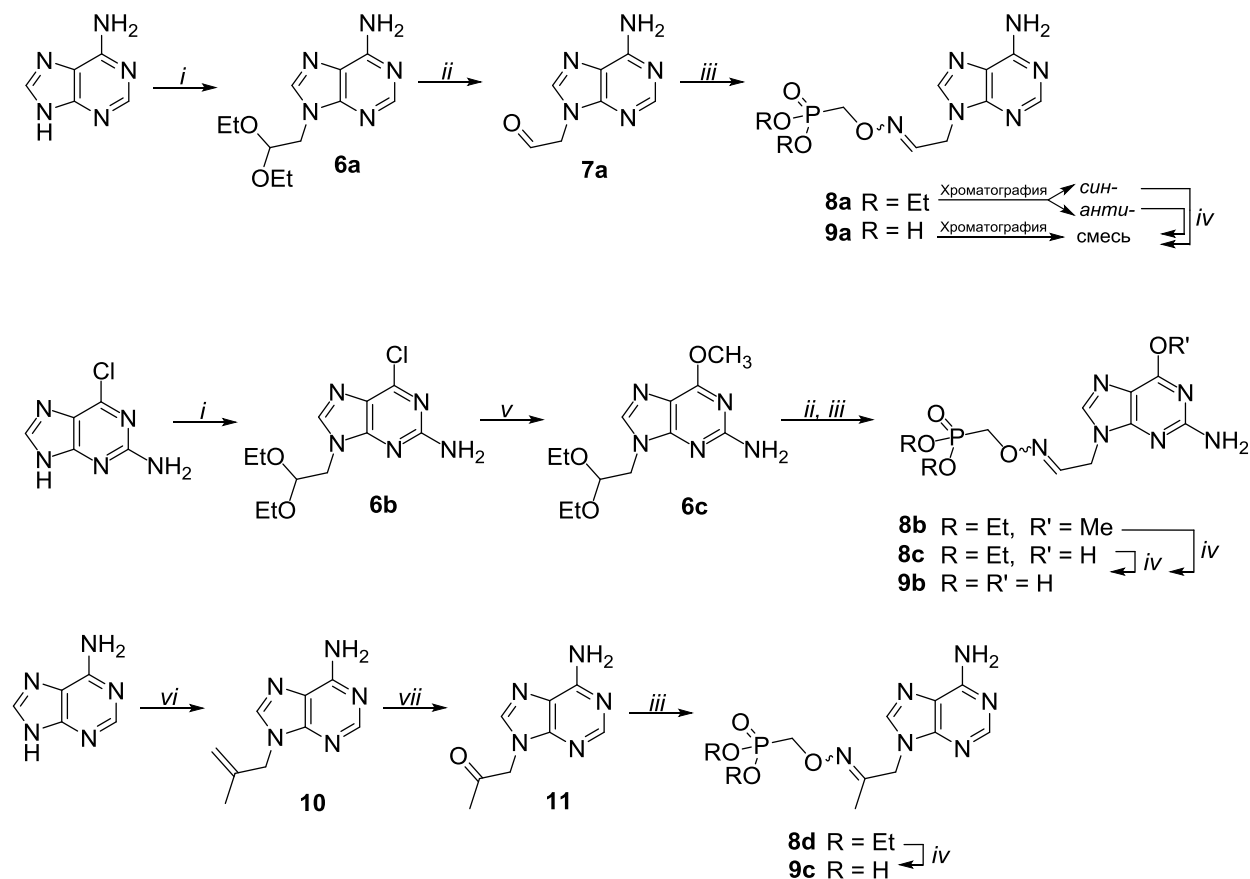


Рис. 7. Синтез новых ациклических нуклеозид-фосфонатных производных.

Условия: *i* – DBU, DMF, 20°C, или Cs₂CO₃, DMF, 60°C, диэтилацеталь бромацетальдегида; *ii* – 0,3М HCl, 37°C; *iii* – **5b**, CH₃CN, 20°C; *iv* – Me₃SiBr, DMF, затем NaHCO₃, H₂O; *v* – CH₃ONa, CH₃OH; *vi* – DBU, DMF, 2-метил-3-бромпропен, 20°C; *vii* – OsO₄, KIO₄, H₂O, диоксан, 20°C.

В качестве основных методов синтеза нами было выбрано алкилирование аденина и 2-амино-6-хлорпурина в присутствии DBU или Cs₂CO₃ (Таблица 7). В DMF нами наблюдалась лучшая растворимость образующихся солей пуринов и, одновременно, более высокий выход. Как основание DBU быстро реагирует с пуринами и ускоряет алкилирование, в то время как цезиевые соли пуринов образуют гетерогенную реакционную массу и медленнее алкилируются, но обеспечивают лучшее соотношение N⁹/N⁷ продуктов, чем DBU. В обоих случаях добавление основания к аденину проводилось в DMF при нагревании до 60°C, и спустя 30 мин был добавлен диэтилацеталь бромацетальдегида; для DBU-промотированных реакций не требуется дальнейшее нагревание после растворения исходных компонентов реакции в DMF; Cs₂CO₃ оказался более предпочтительным основанием для алкилирования 2-амино-6-хлорпурина, однако наблюдались незначительные примеси

гуанинового производного – продукта побочного гидролиза хлора в 6 положении. Отнесение N⁹ и N⁷ изомеров проводилось на основании корреляционных спектров 2D ЯМР и УФ спектров.

Таблица 7. Влияние основания на выход продуктов **6a-b** и соотношение изомеров

Нуклеиновое основание	Основание	Температура	Время реакции	Выход алкилированных продуктов	Соотношение N ⁹ /N ⁷ изомеров
Аденин	Cs ₂ CO ₃	60°C	48 ч	75%	6 : 1
	DBU	60°C → 20°C	24 ч	80%	4 : 1
2-Амино-6-хлорпурин	Cs ₂ CO ₃	60°C	48 ч	90%	6 : 1
	DBU	60°C → 20°C	24 ч	95%	5 : 2

Целевые ацетали **6a** и **6b**, полученные в реакциях алкилирования в присутствии оснований DBU и Cs₂CO₃, соответственно, были очищены колоночной хроматографией на силикагеле. Следующей стадией стал синтез 9-(2,2-диэтоксиэтил)-2-амино-6-метоксипурина **6c** из **6b** обработкой метилатом натрия. Дальнейший гидролиз ацеталей в альдегиды проводился в условиях 0,3 М HCl в отсутствие доступа света.

Следует отметить, что известный ранее альдегид **7a** не имел детальной характеристики соединения и методики выделения. Нами были проанализированы сигналы ЯМР **7a** и пути деградации (Рис. 8).

На свету бесцветный продукт **7a** претерпевал фотохимически индуцированную полимеризацию в воде; спустя несколько десятков минут реакционная смесь приобретала вид вязкой массы бордового цвета. Кроме того, согласно данным ЯМР, в DMSO альдегид **7a** лабилен и склонен к перегруппировке Манниха.

Полученный альдегид без хроматографической очистки быстро вводили в “click”-реакцию с диэтил аминооксиметилфосфонатом **5b** (для избежания побочного разложения) с образованием эквимольной смеси *син*- и *анти*-изомеров диэтил 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]этил}аденина **8a**.

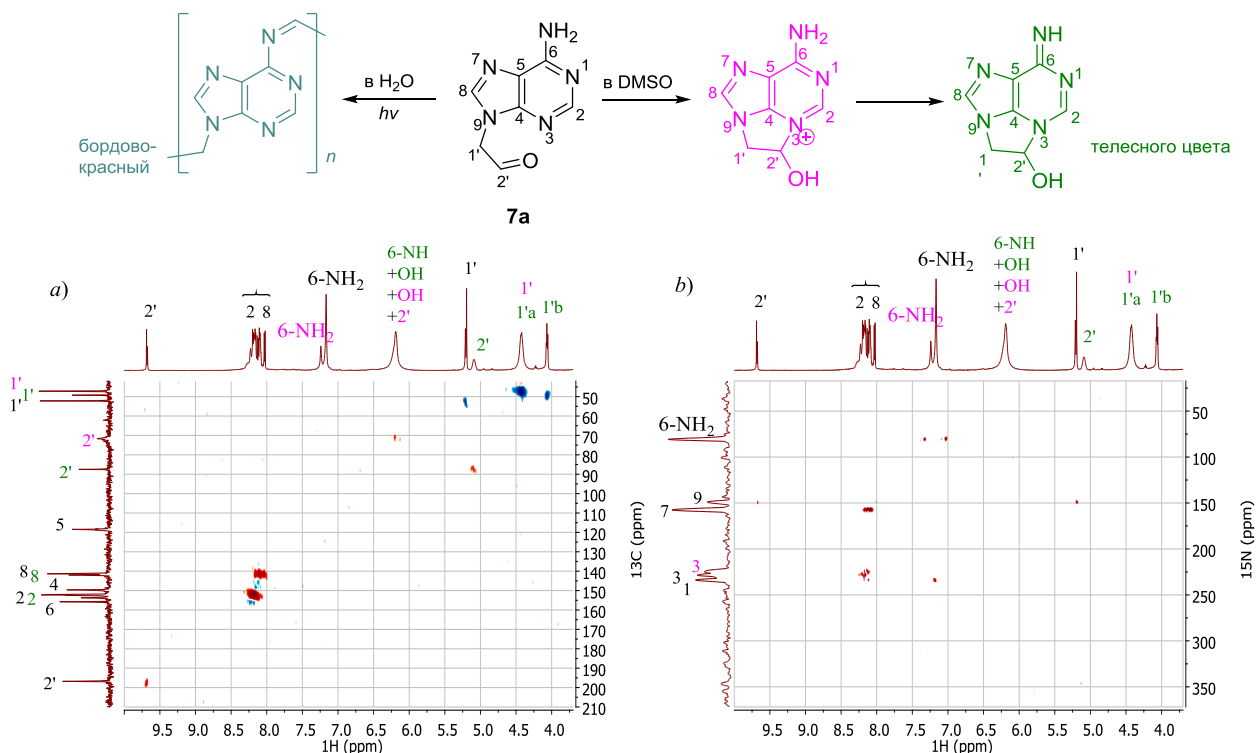


Рис. 8. Разложение альдегида **7a** в ДМСО и в воде на свету: а) HSQC спектр в DMSO- d_6 , б) ^{15}N -H HMBC спектр в DMSO- d_6 .

2-Амино-6-метоксипуриновый аналог **6c** гидролизовали в кислой среде последовательно, начиная с более лабильного ацетального фрагмента при 0,3M HCl, а в более концентрированной кислоте (1M HCl) происходил гидролиз до полностью деблокированного гуанинового производного (Рис. 9). Оба альдегида были очищены от избытка соляной кислоты, воды и образующегося спирта упариванием на ротаторном испарителе и сразу введены в реакцию оксимирования, образуя, соответственно, **8b** или **8c** в виде смеси *син*- и *анти*- изомеров.

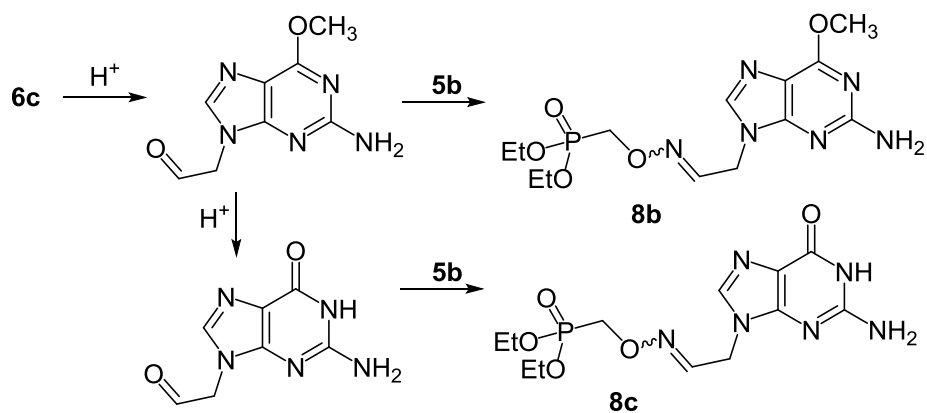


Рис. 9. Получение оксимных ациклических производных гуанина.

Одним из запланированных этапов в получении ациклических нуклеотидов было разделение *син*- и *анти*- изомеров диэтил 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]-

этил}аденина **8a**, которые были получены в соотношении 1:1 в ходе реакции. Ранее было показано на примере алкен-содержащих ациклических нуклеозидных аналогов, что конфигурация влияет на антивирусную активность, которая может варьироваться на порядок в зависимости от изомера.

Анти-изомер может быть получен простой кристаллизацией из 96% этанола или изопропанола при комнатной температуре, однако в растворе *син*-изомер остаётся в смеси с *анти*- в соотношении примерно 3:1 даже при охлаждении.

Син- и *анти*-оксимы характеризуются низким барьером перехода между двумя изомерами. Поэтому была изучена возможность термической изомеризации смеси продуктов при разных температурах, однако нагрев продуктов в ацетонитриле или реакционной массы до 60°-80°C и охлаждение до -10°C не приводят к каким-либо изменениям в соотношении изомеров. Фотоизомеризация с помощью облучения смеси продуктов при 532 нм в ацетонитриле в течение 6 часов позволила обогатиться *анти*-изомером лишь до *анти*-/*син*- соотношения 3:2 (оценочные данные по ТСХ и ЯМР). Окончательно *син*- и *анти*-изомер диэтил 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]-этил}аденина **8a** удалось разделить друг от друга с помощью ТСХ на силикагеле толщиной 2 мм в тщательно подобранной элюирующей системе диоксан : дихлорметан : ацетон : аммиак (30% водн.) / 47,5 : 45 : 5 : 2,5, и при разделении с помощью ВЭЖХ (80% этанол : вода, нелинейный градиент концентраций) (Рис. 10).

Финальной стадией синтеза стала деэтерификация эфиров в мягких условиях с триметилбромсиланом с количественным выходом, которая, однако, вновь обращает разделённые *син*-/*анти*-изомеры в смесь анионных продуктов с примерно равным соотношением. Разделение конечных *син*- и *анти*-изомеров 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]этил}аденина **9a** на ВЭЖХ удаётся произвести, но при стоянии наблюдается повторное образование смеси 1:1. Возможно, в данном случае на лабильность оксимной связи влияет кислотность и анионная природа фосфонатного фрагмента в молекуле.

Финальная стадия деблокирования эфиров **8b** с TMSBr одновременно деблокирует метильную группу 2-амино-6-метоксипуринового основания, количественно образуя гуаниновое производное **9b**. Далее не проводилось попыток разделения *син*-/*анти* изомеров, как в случае с **9a**. Кроме того, было синтезировано кетоксимное производное 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]пропил}аденин **9c** (Рис. 9).

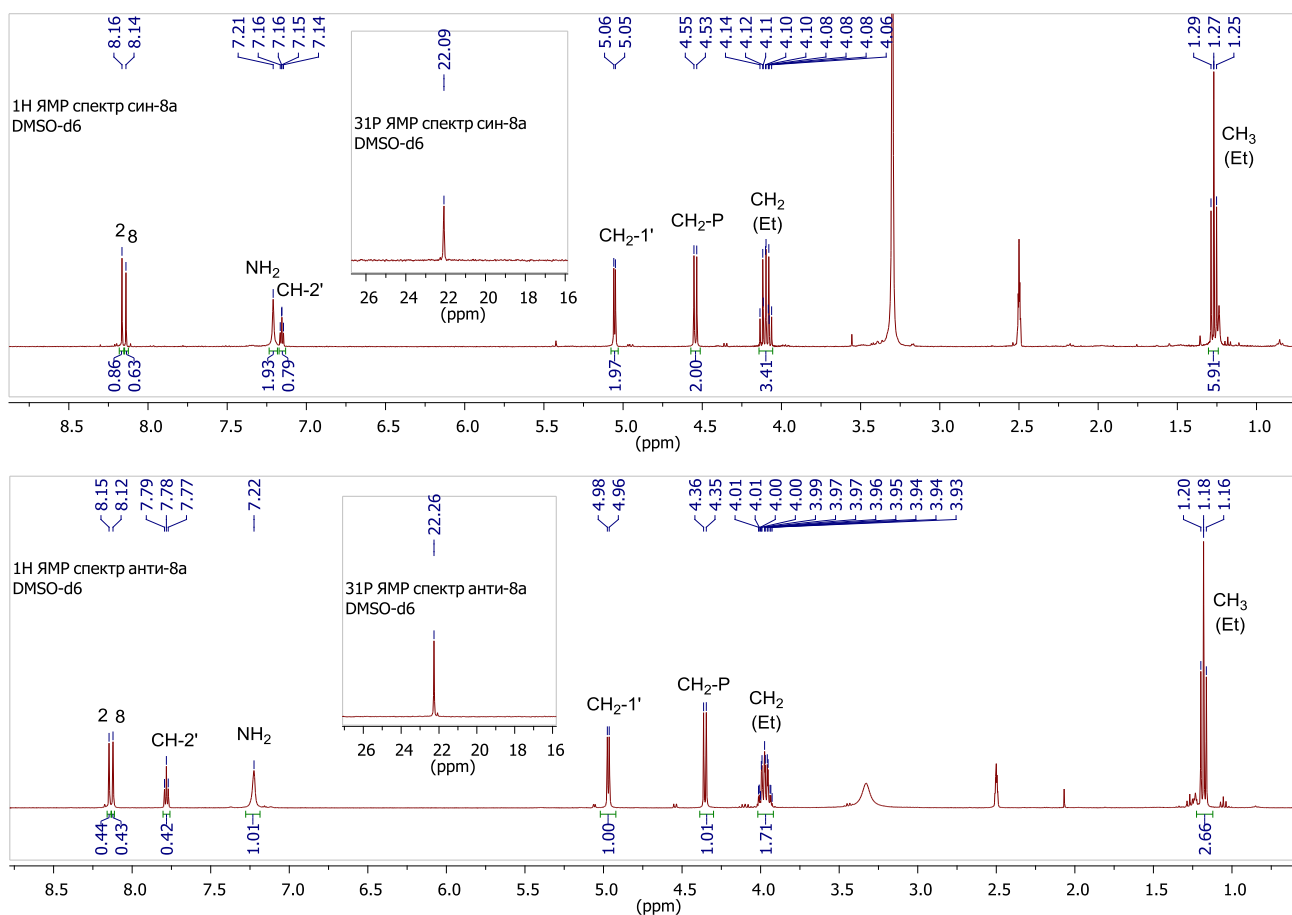


Рис. 10. ^1H и ^{31}P ЯМР спектры разделенных *син*- и *анти*-изомеров **8a**.

Алкилирование аденина 3-бром-2-метилпропенном и дальнейшее *one-pot* окисление терминальной метилиденовой группы **10** по методике Лемьё-Джонсона позволило получить кетон **11**. Примечательно, что по данным двумерного ЯМР и УФ спектров побочным продуктом алкилирования 3-бром-3-метилпропенном при синтезе соединения **10** был N^3 -изомер, а не N^7 , как в случае с продуктами **6a** и **6b**. Изомеры были разделены колоночной хроматографией. Обработка кетона **11** диэтил аминооксиметилфосфонатом **5b** при умеренном нагревании даёт оксимный продукт **8d** в виде *син*-/*анти*-изомеров в соотношении 3:4, который при дальнейшем деблокировании эфиров превращается в эквимольную смесь *син*-/*анти*-анионных фосфонатов **9c**.

Проведено изучение биологической активности новых аналогов на клетках, инфицированных ВИЧ-1, вирусами семейства герпеса (ВПГ-1 TK^+ и TK^- , ЦМВ) а также на репликоне вируса гепатита С (ВГС) (Таблица 8).

Синтезированные соединения были протестированы в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского на культурах клеток, инфицированных ВИЧ и вирусами семейства герпеса. Показано, что 9-{2-[(фосфометил)оксимино]этил}аденин **9a**

(смесь *син*- и *анти*-изомеров в соотношении 1:1) подавляет развитие ВИЧ на 50% (EC₅₀) при концентрациях около 60 мкМ (клетки МТ-4). Все исследуемые соединения обладают низкой токсичностью в культурах клеток МТ-4 и Vero E6, не удалось получить пороговых значений для 50%-ной концентрации, т.к. она превышает ожидаемые 1 mM. В то же время, соединения оказались малоактивными в отношении герпес-вирусов в клетках Vero E6 и продемонстрировали EC₅₀ между 300 и 350 мкМ для ВПГ-1 и ЦМВ, в десять раз уступая применяемому препарату 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденину (РМЕА), что не может рассматриваться как хороший результат из-за низкого индекса селективности. Однако следует отметить, что вещество не снижало свою активность и в клетках, инфицированных ацикловир-резистентным штаммом вируса ВПГ-1 L₂/R (ТК⁻). Резистентность к ацикловиру вызвана дефектом в гене, кодирующем тимидинкиназу, ответственную за фосфорилирование нуклеозидного аналога; нуклеотидные аналоги, имеющие негидролизующий фосфонатный фрагмент – миметик природного фосфата – не нуждаются в фосфорилировании этим ферментом.

Таблица 8. Антивирусная активность ациклических нуклеотидных аналогов

Вещество	ВИЧ-1 (клетки МТ-4)		ВПГ-1 (штаммы L ₂ [*] и L ₂ /R [#]) (клетки Vero E6)			ВГС (репликон в клетках Huh7)	
	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	[*] EC ₅₀ , мкМ	[#] EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ
9a	57	>1000	354	354	>708	52	173
9b	85	>1000	>300	n/a	>800	>300	480
9c	100	>1000	>300	n/a	>800	>300	973
РМЕА	2	>227	35	35	>1133	52	n/a

Кроме того, соединения были протестированы в нашей лаборатории на репликоне вируса гепатита С в клетках Huh-7, и 9-{2-[(фосфонометил)оксимино]-этил}аденин **9a** показал активность около 52 мкМ, сравнимую с другим противовирусным ациклическим нуклеозид-фосфонатом РМЕА.

Адениновые производные обладают более высокой активностью, возможно, в виду лучшего фосфорилирования клеточными киназами в активные трифосфаты.

Таким образом, нами были разработаны методики синтеза и получены фосфонатные и карбаматные производные нуклеозидных аналогов с выраженной анти-ВИЧ активностью, показавшие пролонгированное высвобождение исходных нуклеозидов *in vivo* и низкую токсичность, что отвечало целям проекта по синтезу низкотоксичных форм применяемых лекарств. Реализована концепция создания ациклических фосфонатов нуклеозидов с оксимным фрагментом цепи, обладающих высокой водорастворимостью и низкой токсичностью для неинфицированных клеток, впервые показана их активность в отношении нескольких типов вирусов.

Выводы

- В рамках работы синтезированы 4 класса новых соединений: моно- и бис-нуклеозидные фосфонаты, карбаматы 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT), фосфонатные производные ациклических нуклеозидных аналогов с оксимным фрагментом в цепи. Все соединения охарактеризованы комплексом физико-химических методов.
- Синтезированы новые депо формы ингибиторов репликации ВИЧ на основе карбаматных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и показана их анти-ВИЧ активность в культуре клеток. Наиболее эффективным оказался морфолинокарбамат AZT. Изучены фармакокинетические параметры соединений на животных моделях: соединения проявляют низкую токсичность и имеют пролонгированное время жизни в организме.
- Получены фосфонатные производные гомодимеров AZT и гетеродимера AZT и ЗТС, являющиеся депо-формами соответствующих нуклеозидов. Наиболее активным анти-ВИЧ ингибитором среди синтезированных соединений был бис-AZT фторметилфосфонат. Изучена стабильность соединений в условиях химического и ферментативного гидролиза в плазме крови человека. Показана корреляция между временем жизни соединений в плазме крови и эффективностью подавления ВИЧ в культуре клеток.
- Разработаны схемы синтеза и получены новые фосфонатные производные ациклических нуклеозидных аналогов с активностями против вирусов нескольких типов (ВИЧ, вирусы герпеса, гепатита С). Альдоксимное ациклическое фосфонатное производное аденина показало себя перспективным

соединением для дальнейшего изучения и разработки ингибиторов репликации ВИЧ. Оптимизирована методика синтеза и выделения диэтил аминооксиметилфосфоната как удобного интермедиата для функционализации карбонильных производных фосфонатным остатком.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Статьи в журналах:

1. P.N. Solyev, M.V. Jasko, A.A. Kleymenova, M.K. Kukhanova, S.N. Kochetkov Versatile synthesis of oxime-containing acyclic nucleoside phosphonates – synthetic solutions and antiviral activity. // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2015. – V. 13. – Issue 44. – P. 10946-10956.
2. P.N.Solyev, M.V. Jasko, I.L. Karpenko, Yu.A. Sharkin, A.V. Shipitsyn, M.K. Kukhanova. New dinucleoside phosphonate derivatives as prodrugs of 3'-azido-3'-deoxythymidine and β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine: synthesis and anti-HIV properties. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2014. – V. 33 – Issue 2. – P. 64-79.
3. P.N. Solyev, A.V. Shipitsin, I.L. Karpenko, D.N. Nosik, L.B. Kalnina, S.N. Kochetkov, M.K. Kukhanova, M.V. Jasko. Synthesis and anti-HIV properties of new carbamate prodrugs of AZT. // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2012. – V. 80. – Issue 6. – P. 947-952.
4. A.L. Khandazhinskaya, M.V. Jasko, I.L. Karpenko, P.N. Solyev, N.A. Golubeva, M.K. Kukhanova. 5'-Phosphonate derivatives of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine as new anti-HIV prodrugs. // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2011. – V. 78. – Issue 1. – P. 50-56.
5. М.В. Ясько, А.В. Шипицын, А.Л. Хандажинская, Е.А. Широкова, П.Н. Сольев, О.А. Плясунова, А.Г. Покровский Новые производные алкил- и аминокарбонилфосфоновых кислот, содержащие 3'-азидо-3'-дезокситимидин. // *Биоорганическая химия*. – 2006. – Т. 32. – С. 603-608.

Патент:

1. Ясько М.В., Шипицын А.В., Сольев П.Н., Хандажинская А.Л., Бибилашвили Р.Ш., Волосюк Т.П., Голубева Н.А., Кононов А.В. Уретановые производные

3'-азидо-3'-дезокситимидина – потенциальные противовирусные препараты. Патент. Дата подачи: 30.12.2009. Регистрационный номер: 2009149067/04 (072557).

Тезисы конференций:

1. P.N. Solyev, M.V. Jasko, M.K. Kukhanova. New Acyclic Nucleoside Phosphonates Bearing Unsaturated Fragments in the Chain. Synthesis and Antiviral Properties. // Тезисы докладов. 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (MedChem-2015), г. Новосибирск, – 2015. – с.281.
2. P.N. Solyev, M.V. Jasko, M.K. Kukhanova. *The design, synthesis and antiviral activity of new acyclic nucleoside phosphonates bearing unsaturated fragments in the chain.* // 28th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Италия, г. Рим, 11-15 мая 2015 г. Program and abstracts book, p.87.
3. P.N. Solyev, M.V. Jasko, M.K. Kukhanova. *Novel acyclic phosphonate nucleoside analogues with oxime fragment in the chain. Synthesis and antiviral activity. Aminooxy group as a convenient substrate for drug development.* // Innovative Approaches for Identification of Antiviral Agents Summer School (2nd IAAASS), Италия, Санта Маргерита ди Пула, 28 сентября - 3 октября 2014 г. Program & abstract book, p.49.
4. P.N. Solyev, M.V. Jasko, M.K. Kukhanova. *Novel acyclic phosphonate nucleosides with oxime fragment in the chain: synthesis and antiviral activity.* // 15th Tetrahedron Symposium – Challenges in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry, Великобритания, г. Лондон, 24-27 июня 2014 г. Interactive abstract book, 2014.
5. П.Н. Сольев, М.В. Ясько, И.Л. Карпенко, А.В. Шипицын, М.К. Куханова. *Синтез и анти-ВИЧ свойства новых фосфонатных гомо- и гетеродимеров препаратов 3'-азидо-3'-дезокситимидина и β-L-дидезокси-3'-тиацитидина.* // Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia) с международным участием. Москва, Президиум Российской академии наук, 8-12 сентября 2013 г. Тезисы докладов, с.146.
6. P.N. Solyev, M.V. Yasko, M.K. Kukhanova. *9-{2-[(Phosphonomethyl)oximino]ethyl}-adenine – acyclic phosphonate analogue with broad antiviral activity.* // 38th FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Congress 2013, “Mechanisms in Biology”. г. Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г., FEBS Journal, 2013, 280 (Suppl. 1): p.362.

7. П.Н. Сольев. *Нуклеозидные аналоги и их депо-формы, обладающие анти-ВИЧ и антигерпетической активностью*. // Осенний финал «У.М.Н.И.К.» РАН – 2012. Москва, Президиум Российской академии наук, 15 ноября 2012 г. Тезисы докладов, с.47-48.
8. П.Н. Сольев, М.В. Ясько. *Синтез новых депо-форм нуклеозидов с потенциальной противовирусной активностью*. // IV Всероссийский научно-практический семинар молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств». г. Волгоград, Волгоградский государственный медицинский университет, 29-31 октября 2012. Вестник Волгоградского медицинского университета, 2012, 4 (Приложение: материалы семинара): с.69-70.
9. П.Н. Сольев. *Нуклеозидные аналоги и их депо-формы, обладающие анти-ВИЧ и антигерпетической активностью*. // Весенний «У.М.Н.И.К.» РАН – 2012. Москва, Президиум Российской академии наук, 27 апреля 2012 г. Тезисы докладов, с.31-33.

Для заметок