



УДК 577.113.3

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 3'-АЗИДО-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИНА И ФОСФОНОМУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ

© 2004 г. Е. А. Широкова^{*#}, М. В. Ясько^{*}, А. Л. Хандажинская^{*},
А. В. Иванов^{*}, Д. В. Январев^{*}, Ю. С. Скоблов^{*}, Т. Р. Проняева^{**},
Н. В. Федюк^{**}, А. Г. Покровский^{**}, М. К. Куханова^{*}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

^{**}Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" МЗ РФ,
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 03.02.2003 г. Принята к печати 18.04.2003 г.

Осуществлен синтез новых 5'-(алкил)этоксикарбонилфосфонатов и 5'-(алкил)аминокарбонилфосфонатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT). Изучена их устойчивость к химическому гидролизу и антивирусные свойства в клеточных культурах, инфицированных ВИЧ-1. В фосфатном буфере при pH 7.2 аминокарбонилфосфонатные производные AZT оказались более стабильными, чем соответствующие этоксикарбонилфосфонаты. Показано, что в культуре клеток МТ-4 терапевтический индекс (индекс селективности) ряда полученных соединений превосходил таковой для исходного AZT вследствие более высокой антивирусной активности.

Ключевые слова: 3'-азидо-3'-дезокситимидин, вирус иммунодефицита человека; фосфонаты нуклеозидов.

ВВЕДЕНИЕ

Понимание природы синдрома приобретенного иммунодефицита и обнаружение возможных мишеней для воздействия антивирусных агентов позволило создать ряд лекарств для терапии ВИЧ. Наиболее широко применяемым анти-ВИЧ-препаратом нуклеозидной природы является AZT.

Сравнительно недавно было показано, что некоторые 5'-фосфонатные производные модифицированных нуклеозидов обладают высокой противовирусной активностью и при этом малотоксичны. В качестве удачного примера применения фосфонатных аналогов нуклеозидов в медицине можно рассматривать 5'-*H*-фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (препарат "Никавир"), используемый в настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции [1, 2].

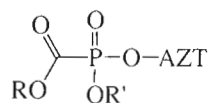
Одной из групп соединений, направленных на подавление репродукции ВИЧ, являются эфиры AZT и фосфономуравьиной кислоты типа (I). Со-

единения (Ia) были синтезированы в расчете на то, что оба фрагмента биологически активны и будут давать эффект синергизма. Однако этот эффект не был обнаружен, хотя соединения показали хорошую активность в ВИЧ-инфицированных клеточных культурах, резистентных к действию AZT [3, 4]. Триэфиры типа (Ib), обладающие значительной липофильностью, показали выраженные анти-ВИЧ-свойства, но были недостаточно стабильными при выделении [5].

В данной работе описан синтез и исследована стабильность AZT-содержащих триэфиров (II) и соответствующих амидоэфиров (III), а также результаты их антивирусных испытаний в клеточных культурах, инфицированных ВИЧ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Триэфир (IIa) ранее был синтезирован реакцией AZT с монохлорангидридом (этил)этоксикарбонилфосфоната [3]. Выход продукта в этом

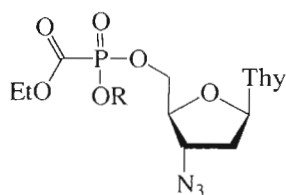


(Ia), R = Me, Et, R' = H

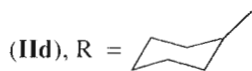
(Ib), R = C₈H₁₇, (CH₃)₃CC(O)S(CH₂)₂-, R' = AZT

Сокращения: TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид; AZT – 3'-азидо-2',3'-дезокситимидин; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ИД₅₀ и ИД₉₀ – дозы, ингибирующие репликацию вируса на 50 и 90%; ЦД₅₀ – доза, вызывающая гибель 50% клеток; ИС – индекс селективности (ЦД₅₀/ИД₅₀).

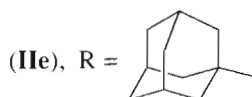
[#]Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: shirokova-elena@list.ru).



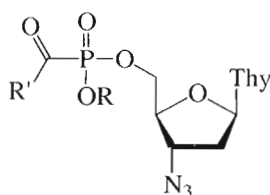
(IIa), R = Et

(IIb), R = PhCH₂CH₂(IIc), R = Prⁱ

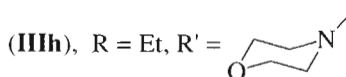
(IId), R =



(IIe), R =

(IIIa), R = Et, R' = NH₂(IIIb), R = Me, R' = NH₂(IIIc), R = Pr, R' = NH₂(IIId), R = Prⁱ, R' = NH₂(IIIe), R = (CH₃)₃CCH₂, R' = NH₂

(IIIf), R = Et, R' = MeNH

(IIIg), R = Et, R' = PhCH₂CH₂NH

(IIIh), R = Et, R' =

случае составляет 60–70%. Однако этот синтетический подход не позволяет варьировать заместители фосфонатного остатка.

Общая схема синтеза целевых триэфиров (II) и амидоэфиров (III) включает получение соответствующих заряженных производных (IV) и (V) и последующую их этерификацию (схема).

Ранее мы синтезировали соединения типа (IV) из соответствующих нуклеозидов и этоксикарбонилфосфоновой кислоты, используя в качестве

конденсирующего агента *N,N*-дициклогексилкарбодиимид [6]. Выходы продуктов при этом не превышали 70%. В данной работе фосфоноформиат (IV) был получен конденсацией AZT с этоксикарбонилфосфоновой кислотой в присутствии пивалоилхлорида с выходом 85%. Взаимодействие полученного фосфоната (IV) с рядом первичных аминов с высоким выходом приводило к соответствующим амидам (V). Со вторичными аминами реакция протекала менее однозначно. Так, при

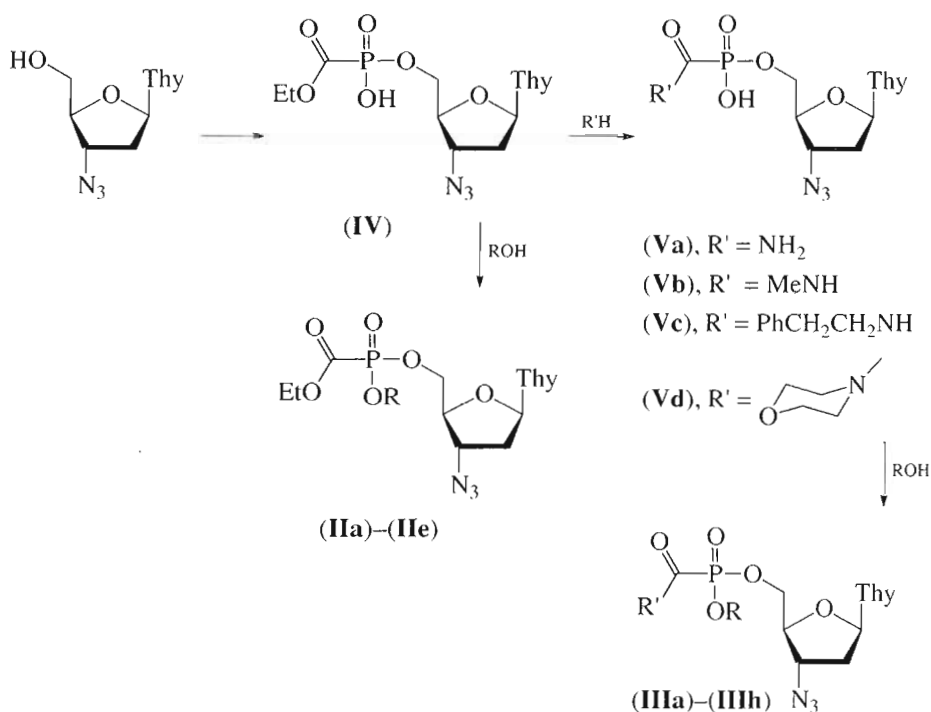


Схема.

взаимодействии с диэтиламином в качестве основного продукта реакции был выделен 5'-*H*-фосфонат AZT. Напротив, кипячение с морфолином привело к образованию целевого амида (**Vd**) с достаточно высоким выходом (77%).

Этерификацию фосфонатов (**IV**) и (**V**) осуществляли конденсацией с соответствующими спиртами в присутствии TPS-Cl (метод **A**) или в условиях реакции Мицунобу (метод **B**). Недостатком первого метода является необходимость использования большого избытка конденсирующего агента (3 экв.) вследствие протекания побочной реакции образования соответствующего эфира 2,4,6-трипропилбензолсульфокислоты и используемого спирта. Реакция Мицунобу протекает в нейтральной среде, что делает ее весьма привлекательной для синтеза рН-чувствительных соединений, но выходы продуктов существенно понижаются при переходе от первичных к вторичным спиртам [7].

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (см. "Эксперимент. часть"), их УФ-спектры соответствуют таковым для тимидиновых производных (данные не приведены).

Появление нового асимметрического центра при атоме фосфора в соединениях (**II**) и (**III**) приводит к возможности образования двух диастереомеров. Действительно, в ³¹P-ЯМР-спектрах, зарегистрированных с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, для фосфонатов (**II**) и (**III**) наблюдали два синглетных сигнала в соотношении примерно 1 : 1. В ¹H-ЯМР-спектрах наличие двух диастереомеров наиболее четко проявляется для протонов H6 и 5-CH₃ тимина, которые, как правило, представлены двумя наборами сигналов (см. "Эксперимент. часть").

Таблица 1. Стабильность соединений (**II**) и (**III**) в фосфатном буфере (рН 7.2, 20°C, данные усреднены по трем экспериментам; экспериментальная ошибка не превышала 20%)

Соединение	$\tau_{1/2}^*$, мин
(IIa)	10
(IIc)	40
(IIIa)	150
(IIIc)	205
(IIId)	390
(IIIf)	360
(IIIg)	≥600

* Время гидролиза половинного количества.

Интересно также отметить, что в ¹H-ЯМР-спектрах (растворителем служил CD₃CN) протоны амидной группы NH₂CO соединения (**IIIa**) наблюдали в виде двух групп сигналов – синглета при 7.24 м.д. и дублета с константой ³J_{P-H} 35 Гц при 6.83 м.д. В процессе хроматографии на силикагеле удалось получить фракцию, обогащенную одним из диастереомеров (более 90%). ³¹P-ЯМР-спектр подтвердил гипотезу о взаимодействии атома фосфора с одним из протонов амидной группы с константой около 35 Гц (рис. 1).

Стабильность синтезированных соединений изучали в фосфатном буфере при рН 7.2 при 20°C (табл. 1). Состав компонентов смеси анализировали методом ВЭЖХ на обращенно-фазовом носителе. В случае триэфиров (**II**) наблюдалось образование двух продуктов: нуклеозида (AZT) и соответствующего эфира *H*-фосфоната AZT (образцы

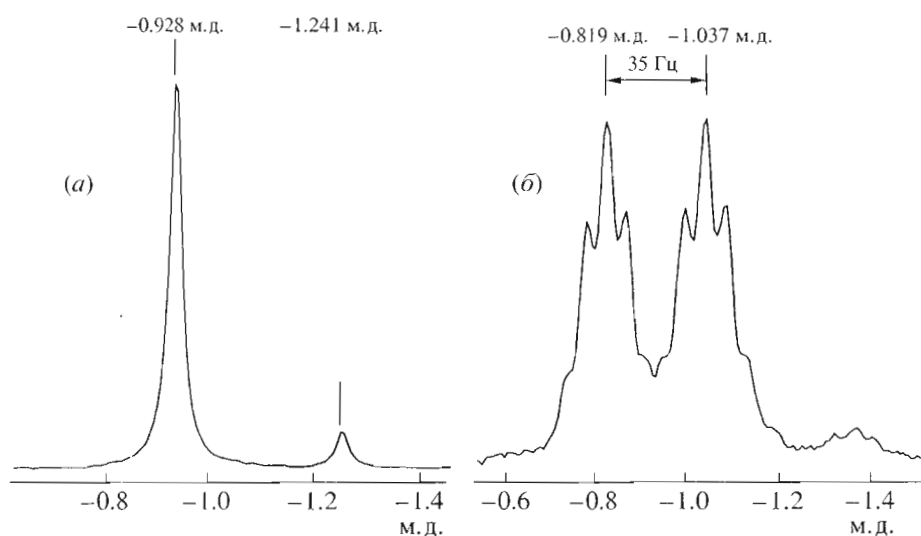


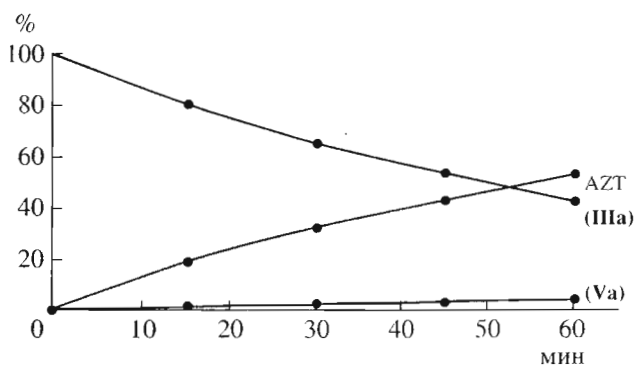
Рис. 1. ³¹P-ЯМР-спектры (CDCl₃) амида (**IIIa**), обогащенного одним из диастереомеров, снятые с подавлением (а) и без подавления фосфор-протонного взаимодействия (б).

Таблица 2. Анти-ВИЧ-активность синтезированных фосфонатов

Соединение	ЦД ₅₀ , мкМ	ИД ₅₀ , нМ	ИД ₉₀ , нМ	ИС
(IIa)	141.7	7.1	16	20140
(IIb)	197.1	3.9	75	50539
(IIc)	67.4	9	47	7489
(IId)	37.1	6.4	31	5797
(IIe)	195.5	600	3900	326
(IIIa)	248.6	7.7	19	32286
(IIIb)	103	2.6	>2.6	39623
(IIIc)	48	9.6	28.8	5000
(IIId)	240.2	2	6	120100
(IIIe)	69.8	<2.2	<220	>31727
(IIIf)	112.9	0.24	7.2	470417
(IIIg)	69.1	0.9	2.2	76777
(IIIh)	127.0	<2.1	2.1	>60476
AZT	187.5	17	750	11029

сравнения были синтезированы по методу [8]), содержание которого не превышало 30% общей суммы продуктов. Гидролиз амидов (III) приводил главным образом к нуклеозиду, а в качестве минорных продуктов были выделены соответствующие заряженные амиды (V).

Для более подробного изучения устойчивости полученных соединений в различных условиях мы выбрали фосфонат (IIIa), превращения которого исследовали при температуре 37°C и pH среды 7.2. При гидролизе соединения (IIIa) были обнаружены два продукта, причем один из них по скорости образования значительно преобладал над другим (рис. 2). Преобладающим продуктом являлся AZT, а минорным – аминокарбонилфосфонат AZT (Va). Для идентификации продуктов гидролиза использовали аутентичные образцы AZT и фосфоната (Va).

**Рис. 2.** Кривая гидролиза фосфоната (IIIa) при 37°C и pH 7.2.

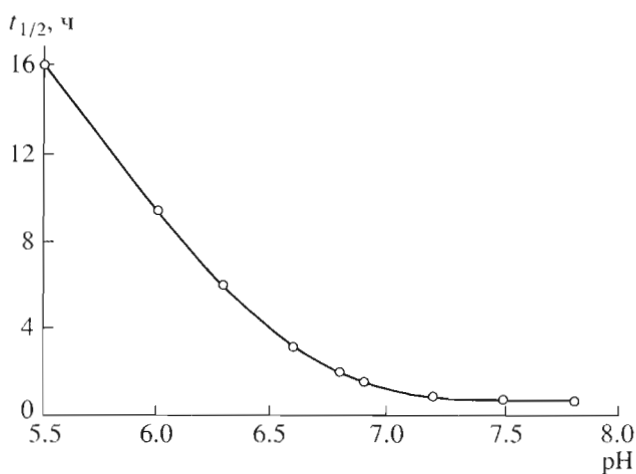
Мы также изучили химическую стабильность амида (IIIa) в 0.05 М фосфатном буфере в интервале pH 5.5–7.8 при 37°C (рис. 3). Время гидролиза половинного количества при pH 5.5 составляло около 16 ч, а при pH 7.8 оно сократилось до 34 мин. В области pH 7.2–7.8 рост скорости гидролиза практически прекращается. Время гидролиза половинного количества фосфоната при pH 7.2 составило около 50 мин.

Антивирусную активность исследовали на клетках MT-4, инфицированных ВИЧ-1, штамм ГКВ-4046 (табл. 2). Способность исследуемых веществ подавлять репродукцию вируса оценивали, измеряя концентрацию вирусного антигена p24. Вещества вносили после адсорбции вируса (см. “Эксперимент. часть”).

Одной из задач текущего этапа исследований по конструированию новых антивирусных препаратов стало повышение эффективности действия уже используемых. Этого можно достичь введением в активную молекулу таких модификаций, которые бы улучшали биодоступность препаратов, повышали их проникновение через клеточные мембраны, скорость превращения в активную форму, изменяли катаболизм и т.д.

Нам показалось целесообразным синтезировать фосфоноформаты AZT типа (II) и (III), содержащие различные заместители как при атоме фосфора, так и при карбонильной группе, и провести более детальное исследование их биохимических и анти-ВИЧ-свойств.

Можно отметить, что в случае триэфиров (II) антивирусная активность соединений, содержащих остатки первичных спиртов при атоме фосфора (производные (IIa) и (IIb)), увеличилась; введение остатков вторичных спиртов (соединения (IIc) и (IId)) увеличило токсичность по сравнению с исходным нуклеозидом, а введение ос-

**Рис. 3.** Кривая зависимости времени гидролиза половинного количества амида (IIIa) от pH среды.

татка третичного спирта (триэфир (IIe)) вызвало существенное понижение анти-ВИЧ-активности.

В целом, в случае аминокарбонилфосфонильных производных AZT (III) мы наблюдали более выраженное увеличение анти-ВИЧ-активности, чем для триэфиров (II) (табл. 2).

Гидролиз соединений (II) и (III) протекал различно. Если в случае амидоэфиров (III) происходило расщепление одной из фосфоэфирных связей, преимущественно с образованием остатка AZT, то в случае триэфиров (II) процесс был более сложным. Помимо появления AZT, наблюдалось также образование *P*-алкильных эфиров 5'-*H*-фосфоната AZT, вероятно, вследствие последовательного отщепления остатка этилового спирта при карбонильной группе триэфиров (II) и декарбокислирования образующегося 5'-(этил)карбокисфосфоната AZT, аналогично описанному в работе [9]. Аминокарбонилфосфонильные производные AZT (III) оказались заметно более стабильными в фосфатном буфере, чем триэфиры (II).

По-видимому, синтезированные нами фосфонаты выступают в клеточных культурах исключительно как депо-формы AZT. Эффект понижения токсичности и повышения противовирусной активности может быть связан с лучшей биодоступностью таких производных. Одним из факторов увеличения терапевтического индекса (индекса селективности) амидных аналогов по сравнению с триэфирами может быть более высокая стабильность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали триметилбромсилан, диэтилазодикарбоксилат, трифенилфосфин, триэтилфосфоформиат (Fluka, Швейцария); TPS-Cl, пиридин и DMF (Aldrich, США). AZT был предоставлен ЗАО "АЗТ".

Адсорбционную колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (40–60 мкм, прямая фаза) и LiChroprep RP-8 и RP-18 (25–40 мкм, обращенная фаза) (Merck, Германия). Ионообменную колоночную хроматографию осуществляли на носителе DEAE-Toyopearl (HCO₃⁻-форма) (Toyosoda, Япония). ВЭЖХ проводили на хроматографе Gilson, снабженном насосами модели 307 и 311 (Франция) и интегратором LKB 2220.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (приведены химические сдвиги в шкале δ относительно внутренних стандартов – Me₄Si для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоната натрия (DSS) для D₂O и КССВ в герцах) и 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия; приведены химические сдвиги относительно внешнего стандарта – 85%

фосфорной кислоты). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре COMPACT MALDI-4 (Kratos Analytical, США).

5'-(Этоксикарбонил)фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IV). К раствору триэтилфосфоформиата (1 мл, 5.28 ммоль) в CCl₄ (2 мл) при 0°C приливали триметилбромсилан (2 мл, 15.5 ммоль) и выдерживали 16 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, затем упаривали с толуолом (3 × 10 мл), к остатку приливали смесь (4 мл) пиридина с водой (1 : 1). Через 1 ч раствор упаривали, затем упаривали с пиридином (3 × 10 мл), растворяли в пиридине (20 мл), добавляли AZT (0.9 г, 3.37 ммоль) и пивалоилхлорид (0.6 мл, 4.87 ммоль). Реакционную массу перемешивали 18 ч при 6°C, затем разбавляли водой до 100 мл, наносили на колонку (3 × 20 см) с DEAE-Toyopearl и элюировали в линейном градиенте концентрации NH₄HCO₃ в воде (0 → 0.15 М). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, затем упаривали с водой (5 × 10 мл). Остаток растворяли в воде (2 мл) и наносили на колонку (2.5 × 25 см) с LiChroprep RP-8, элюировали водой. Поглощающие в УФ-диапазоне фракции упаривали, получали 1.2 г (85%) фосфоната (IV) в виде аммониевой соли. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.58 (1 H, м, H6), 6.15 (1 H, т, J 7.5, H1'), 4.4 (1 H, м, H3'), 4.10 (2 H, м, CH₂CH₃), 4.07 (3 H, м, H4', H5'), 2.38 (2 H, м, H2'), 1.78 (3 H, уш.с, 5-CH₃), 1.11 (3 H, т, J 7.1, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): –4.93 (с). Масс-спектр: *m/z* 403.1 [M⁺], рассчитано 403.09.

Общая методика синтеза амидов (Va)–(Vd). Фосфонат (IV) (0.2 ммоль) выдерживали 18 ч при комнатной температуре в 25% водном растворе аммиака (5 мл), или в 25% растворе водного метиламина (5 мл), или фенетиламина (2 мл), или кипятили 3 ч в морфолине (3 мл). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 × 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH₄HCO₃ в воде (0 → 0.1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 × 18 см) с LiChroprep RP-18 (для (Va), (Vb)) или LiChroprep RP-8 (для (Vc), (Vd)) и элюировали водой. Целевые фракции упаривали.

5'-(Аминокарбонил)фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Va). Выход 94%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.82 (1 H, м, H6), 7.17 (1 H, с, NH₂, H₃), 7.13 (H, с, NH₂, H_b), 6.12 (1 H, т, J 6.9, H1'), 4.50 (1 H, м, H3'), 3.95 (3 H, м, H4', H5'), 2.30 (2 H, м, H2'), 1.81 (3 H, уш.с, 5-CH₃). ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆): –1.56 (с). Масс-спектр: *m/z* 374.1 [M⁺], рассчитано 374.07.

5'-(Метиламинокарбонил)фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Vb). Выход 91%. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.52 (1 H, с, H6), 6.06 (1 H, т, J 6.7, H1'), 4.32 (1 H, м, H3'), 4.01 (3 H, м, H4', H5'), 2.61 (3 H, с, CH₃NH), 2.32 (2 H, м, H2'), 1.72 (3 H, с, 5-CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): –1.40 (с). Масс-спектр: *m/z* 388.1 [M⁺], рассчитано 388.09.

5'-[(Фенетиламино)карбонил]фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Vc). Выход 86%. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.42 (1 H, с, Н6), 7.10 (5 H, м, C_6H_5), 6.02 (1 H, т, J 6.5, Н1'), 4.17 (1 H, м, Н3'), 3.90 (1 H, м, Н4'), 3.81 (2 H, м, Н5'), 3.39 (2 H, м, CH_2NH), 2.69 (2 H, м, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2.24 (2 H, м, Н2'), 1.68 (3 H, с, 5- CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): -1.57 (с). Масс-спектр: m/z 478.1 [M^+], рассчитано 478.14.

5'-[(1-Морфолино)карбонил]фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Vd). Выход 77%. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.69 (1 H, с, Н6), 6.15 (1 H, т, J 6.5, Н1'), 4.48 (1 H, м, Н3'), 4.17 (1 H, м, Н4'), 4.11 (2 H, м, Н5'), 3.53–3.86 (8 H, 4м, морфолин), 2.41 (2 H, м, Н2'), 1.79 (3 H, с, 5- CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): -1.43 (с). Масс-спектр: m/z 444.1 [M^+], рассчитано 444.12.

Общая методика синтеза фосфонатов (II) и (III). Метод А. К раствору фосфоната (IV) или (V) (0.2 ммоль) в пиридине (3 мл) приливали соответствующий спирт (1 мл), охлаждали до 0°C и прибавляли TPS-Cl (0.6 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток хроматографировали на колонке (2 × 25 см) с силикагелем, элюируя в градиенте метанола в хлороформе (0 → 10%). Фракции, содержащие целевые продукты (II) или (III), упаривали досуха в вакууме.

Метод Б. К раствору фосфоната (IV) или (V) (0.2 ммоль) в DMF (2 мл) прибавляли PPh_3 (0.4 ммоль), соответствующий спирт (0.5 мл) и диэтилазодикарбоксилат (0.4 ммоль) при 18°C. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 18°C, упаривали, затем упаривали с толуолом. Остаток хроматографировали на колонке (2 × 25 см) с силикагелем, элюируя в градиенте метанола в хлороформе (0 → 10%).

5'-(Этил)этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIa) получали по методу А с выходом 67%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 8.98 (1 H, с, 3-NH), 7.43 (1 H, м, Н6), 6.27 (1 H, т, J 7.5, Н1'), 4.4 (1 H, м, Н3'), 4.31 (4 H, м, CH_2CH_3), 4.2 (2 H, м, Н5'), 4.07 (1 H, м, Н4'), 2.25 (2 H, м, Н2'), 1.88 (3 H, уш.с, 5- CH_3), 1.57 и 1.52 (6 H, 2м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): -4.84 (с), -4.37 (с). Масс-спектр: m/z 431.1 [M^+], рассчитано 431.12.

5'-(Фенетил)этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIb) получали по методу А с выходом 53%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.05 (1 H, с, 3-NH), 7.36 (1 H, м, Н6), 7.19–7.29 (5 H, м, C_6H_5), 6.23 (1 H, т, J 7.5, Н1'), 4.47 (2 H, м, Н5'), 4.30 (5 H, м, CH_2CH_3 , CH_2OP , Н3'), 3.97 (1 H, м, Н4'), 3.04 (2 H, т, J 6.8, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2.25 (2 H, м, Н2'), 1.88 (3 H, уш.с, 5- CH_3), 1.32 (3 H, м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -4.13 (с), -4.32 (с). Масс-спектр: m/z 507.2 [M^+], рассчитано 507.15.

5'-(Изопропил)этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIc) получали по методу А с выходом 40%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 9.38 (1 H, с, 3-NH), 7.39 (1 H, м, Н6), 6.15 (1 H, м, Н1'), 4.85 (1 H,

м, Н3'), 4.36 (3 H, м, Н5', $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.30 (2 H, м, CH_2CH_3), 4.06 (1 H, м, Н4'), 2.38 (2 H, м, Н2'), 1.85 (3 H, уш.с, 5- CH_3), 1.36 (6 H, д, J 5.9, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.31 (3 H, м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): -4.53 (с), -4.70 (с). Масс-спектр: m/z 445.1 [M^+], рассчитано 445.14.

5'-(Циклогексил)этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIд) получали по методу А с выходом 54%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 9.27 (1 H, с, 3-NH), 7.41 (0.5 H, кв, 4J 1.2, Н6), 7.42 (0.5 H, кв, 4J 1.2, Н6), 6.14 (1 H, м, Н1'), 4.60 (1 H, м, Н3'), 4.38 (3 H, м, Н5', $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 4.31 (2 H, м, CH_2CH_3), 4.06 (1 H, м, Н4'), 2.39 (2 H, м, Н2'), 1.85 (3 H, м, 5- CH_3), 1.70–1.28 (10 H, м, CH_2 (циклогексил)), 1.30 (3 H, м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): -4.74 (с), -4.90 (с). Масс-спектр: m/z 485.2 [M^+], рассчитано 485.17.

5'-(1-Адамантил)этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIe) получали по методу А с выходом 28%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 9.17 (1 H, с, 3-NH), 7.40 (1 H, м, Н6), 6.15 (1 H, м, Н1'), 4.39 (1 H, м, Н3'), 4.32 (2 H, м, Н5'), 4.28 (2 H, м, CH_2CH_3), 4.04 (1 H, м, Н4'), 2.39 (2 H, м, Н2'), 2.22 (3 H, уш.с, адамантил), 2.14 (6 H, м, адамантил), 1.85 (3 H, уш.с, 5- CH_3), 1.65 (6 H, м, адамантил), 1.30 (3 H, м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): -8.68 (с), -9.13 (с). Масс-спектр: m/z 537.2 [M^+], рассчитано 537.20.

5'-(Этил)аминокарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIa) получали из фосфоната (Va) по методу А с выходом 72%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 9.43 (1 H, с, 3-NH), 7.41 (0.5 H, кв, 4J 1, Н6), 7.39 (0.5 H, кв, 4J 1, Н6), 7.24 (1 H, уш.с, NH_2 , H_a), 6.83 (1 H, д, $^3J_{\text{P-H}}$ 34.9, NH_2 , H_b), 6.14 (1 H, т, J 6.5, Н1'), 4.41 (1 H, м, Н3'), 4.34 (2 H, м, Н5'), 4.21 (2 H, м, CH_2CH_3), 4.03 (1 H, м, Н4'), 2.39 (2 H, м, Н2'), 1.85 (3 H, м, 5- CH_3), 1.33 и 1.32 (3 H, 2т, J 7, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): -0.08 (с), -0.35 (с). Масс-спектр: m/z 402.1 [M^+], рассчитано 402.11.

5'-(Метил)аминокарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIb) получали из фосфоната (Va) и метанола по методу А с выходом 60%. ^1H -ЯМР (CD_3CN): 9.26 (1 H, с, 3-NH), 7.39 (0.5 H, кв, 4J 1, Н6), 7.38 (0.5 H, кв, 4J 1, Н6), 7.18 (1 H, уш.с, NH_2 , H_a), 6.80 (1 H, д, $^3J_{\text{P-H}}$ 34.7, NH_2 , H_b), 6.15 (1 H, т, J 6.5, Н1'), 4.43–4.33 (3 H, м, Н3', Н5'), 4.03 (2 H, м, Н4'), 3.83 (1.5 H, д, J 11, CH_3OP), 3.84 (1.5 H, д, J 11, CH_3OP), 2.38 (2 H, м, Н2'), 1.86 (1.5 H, д, 5- CH_3), 1.85 (1.5 H, д, 5- CH_3), 1.27 (3 H, м, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CD_3CN): 1.12 (с), 0.84 (с). Масс-спектр: m/z 388.1 [M^+], рассчитано 388.09.

5'-(1-Пропил)аминокарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIc) синтезировали из соединения (Va) и пропанола по методу Б. Выход 58%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.08 и 9.06 (1 H, 2с, 3-NH), 7.38–7.33 (2 H, м, Н6, NH_2 , H_a), 6.49 (1 H, д, $^3J_{\text{P-H}}$ 35, NH_2 , H_b), 6.17 (0.5 H, т, J 6.5, Н1'), 6.16 (0.5 H, т, J 6.5, Н1'), 4.42 (3 H, м, Н3', Н5'), 4.15 (2 H, м, CH_2OP), 4.02 (1 H, м, Н4'), 2.41 (2 H, м, Н2'), 1.93

(1.5 Н, с, 5-CH₃), 1.92 (1.5 Н, с, 5-CH₃), 1.74 (2 Н, м, CH₂CH₃), 0.96 (3 Н, т, *J* 7.3, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -0.80 (с), -1.14 (с). Масс-спектр: *m/z* 416.1 [M]⁺, рассчитано 416.12.

5'-[2-(2-Метил)этил](аминокарбонил)фосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIд) синтезировали из соединения (Va) и изопропанола по методу Б с выходом 51%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 9.01 (1 Н, с, 3-NH), 7.41 (0.5 Н, кв, ⁴J 1, H₆), 7.38 (0.5 Н, кв, ⁴J 1, H₆), 7.07 (1 Н, уш.с, NH₂, H_a), 6.69 (1 Н, д, ³J_{Р-Н} 35, NH₂, H_b), 6.14 (0.5 Н, т, *J* 6.6, H1'), 6.15 (0.5 Н, т, *J* 6.6, H1'), 4.79 (1 Н, м, H3'), 4.39 (1 Н, м, CH(CH₃)₂), 4.32 (2 Н, м, H5'), 4.03 (1 Н, м, H4'), 2.38 (2 Н, м, H2'), 1.86 (1.5 Н, д, 5-CH₃), 1.85 (1.5 Н, д, 5-CH₃), 1.35 (6 Н, м, CH(CH₃)₂). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): -1.07 (с), -1.37 (с). Масс-спектр: *m/z* 416.1 [M]⁺, рассчитано 416.12.

5'-(2,2-Диметилпропил)аминокарбонилфосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIе) синтезировали из соединения (Va) и 2,2-диметилпропанола по методу Б с выходом 54%. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.62 (0.5 Н, с, 3-NH), 9.59 (0.5 Н, с, 3-NH), 7.52–7.40 (2 Н, м, H₆, NH₂, H_a), 6.78 (1 Н, д, ³J_{Р-Н} 35, NH₂, H_b), 6.20 (0.5 Н, т, *J* 6.5, H1'), 6.18 (0.5 Н, т, *J* 6.5, H1'), 4.45 (3 Н, м, H3', H5'), 4.05 (1 Н, м, H4'), 3.87 (2 Н, м, CH₂C(CH₃)₃), 2.45 (2 Н, м, H2'), 1.94 (1.5 Н, с, 5-CH₃), 1.93 (1.5 Н, с, 5-CH₃), 0.97 (9 Н, м, C(CH₃)₃). ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -0.81 (с), -1.13 (с). Масс-спектр: *m/z* 444.2 [M]⁺, рассчитано 444.15.

5'-(Этил)метиламинокарбонилфосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIф) синтезировали из соединения (Vb) и этанола по методу Б с выходом 64%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 9.47 (1 Н, с, 3-NH), 7.72 (1 Н, м, CH₃NH), 7.43 (1 Н, с, H₆), 6.22 (1 Н, т, *J* 6.8, H1'), 4.40 (3 Н, м, H3', H5'), 4.22 (2 Н, м, CH₂CH₃), 4.01 (1 Н, м, H4'), 2.91 (1.5 Н, с, CH₃N), 2.89 (1.5 Н, с, CH₃N), 2.39 (2 Н, м, H2'), 1.94 (1.5 Н, с, 5-CH₃), 1.93 (1.5 Н, с, 5-CH₃), 1.37 (3 Н, м, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): -0.10 (с), -0.54 (с). Масс-спектр: *m/z* 416.1 [M]⁺, рассчитано 416.12.

5'-(Этил)(фенетиламино)карбонилфосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIг) синтезировали из фосфоната (Vc) и этанола по методу А с выходом 70%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 9.43 (1 Н, с, 3-NH), 7.62 (1 Н, м, CH₂NH), 7.41 (0.5 Н, с, H₆), 7.40 (0.5 Н, с, H₆), 7.25 (5 Н, м, C₆H₅), 6.15 (1 Н, т, *J* 6.8, H1'), 4.33 (1 Н, м, H3'), 4.27 (2 Н, м, H5'), 4.12 (2 Н, м, CH₂CH₃), 4.00 (1 Н, м, H4'), 3.53 (2 Н, м, CH₂NH), 2.84 (2 Н, т, *J* 7, CH₂C₆H₅), 2.36 (2 Н, м, H2'), 1.86 (0.5 Н, с, CH₃), 1.84 (0.5 Н, с, CH₃), 1.28 (3 Н, м, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): 0.04 (с), -0.40 (с). Масс-спектр: *m/z* 506.2 [M]⁺, рассчитано 506.17.

5'-(Этил)(1-морфолино)карбонилфосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IIIh) синтезировали из соединения (Vd) и этанола по методу А с выходом 47%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 9.43 (1 Н, с, 3-NH), 7.47 (0.5 Н, кв, ⁴J 1.1, H₆), 7.43 (0.5 Н, кв, ⁴J 1.1, H₆), 6.15 (1 Н, т, *J* 6.5, H1'), 4.44 (1 Н, м, H3'), 4.36 (2 Н, м,

H5'), 4.21 (2 Н, м, CH₂CH₃), 4.06 (1 Н, м, H4'), 3.58–3.89 (8 Н, м, морфолин), 2.38 (2 Н, м, H2'), 1.84 (3 Н, уш.с, 5-CH₃), 1.33 (3 Н, т, *J* 7, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): 0.50 (с), 0.30 (с). Масс-спектр: *m/z* 472.1 [M]⁺, рассчитано 472.15.

Изучение устойчивости к гидролизу. Гидролиз соединений (II) и (III) проводили в фосфатном буфере при pH 7.2, 20°C и концентрации изучаемых соединений 0.5 мМ. Через определенные промежутки времени отбирали пробы (10 мкл) и анализировали с помощью ВЭЖХ. Хроматографию проводили на обращенно-фазовом носителе Nucleosil RP-18 (колонка 5 × 150 мм) в следующих условиях: буфер А – 0.065 М NaH₂PO₄, буфер В – 75% этанол; градиент: 0–5 мин – 0% В; 5–10 мин – 0–15% В; 10–30 мин – 15–25% В; 30–35 мин – 25–100% В; скорость потока 0.5 мл/мин.

Стабильность соединения (IIIа) изучали в 0.05 М натрий-фосфатном буфере при температуре 37°C и pH среды в интервале 5.5–7.8 (концентрация фосфоната (IIIа) составляла 0.45 мМ). Через определенные промежутки времени отбирали пробу (10 мкл) и для остановки процесса гидролиза добавляли 0.1 М фосфатный буфер (20 мкл, pH 2.9). Смесь замораживали жидким азотом с последующим хранением образца при -18°C. Состав реакционной смеси анализировали методом ВЭЖХ. Условия хроматографии были аналогичны описанным выше.

Определение антивиральной активности. В работе использовали клетки МТ-4, инфицированные ВИЧ-1 (штамм ГКВ-4046). Множественность заражения составляла 0.2–0.5 ед. на клетку. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной сыворотки, 300 мкг/мл L-глутамина, 80 мкг/мл гентамицина и 30 мкг/мл линкомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для инфицирования использовали клетки в концентрации 2 × 10⁶ ед./мл и жизнеспособностью выше 90%.

Цитотоксичность. Клетки МТ-4 выращивали в присутствии различных доз изучаемых соединений (0.001–100 мг/л) (по три лунки на каждое разведение) на 96-луночном планшете в течение 3 дней. Концентрации и выживаемость клеток измеряли, используя МТТ-тест [10]. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединений, вызывающую гибель 50% клеток (ЦД₅₀).

Анти-ВИЧ-активность. Инфицированные клетки МТ-4 выращивали в присутствии различных доз изучаемых соединений (0.001–100 мг/л) на 96-луночном планшете в течение 3 дней. Анти-ВИЧ-активность соединений определяли иммуноферментным методом путем измерения количества антигена р24 [11]. Строили дозозависимую кривую, по которой рассчитывали количественные характеристики ингибирования репродукции ВИЧ-1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-49009), программы СПИД (тема 31) и МНТЦ (грант № 1244).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Machado J., Salomon H., Oliveira M., Tsoukas C., Krayevsky A.A., Wainberg M.A. // *Nucleosides Nucleotides*. 1999. V. 18. P. 901–906.
2. Покровский В.И., Краевский А.А., Урываев Л.В., Покровский В.В., Мацевич Г.Р., Юрин О.Г., Галегов Г.А., Реиетникова Л.Н. // *Вопросы вирусологии*. 2000. Т. 45. С. 4–7.
3. Rozowsky A., Saha J., Fazely F., Koch J., Rupprecht R.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 172. P. 288–294.
4. Rozowsky A., Fu H., Pai N., Mellors J., Richman D.D., Hostetler K.Y. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 2482–2490.
5. Meier C., Aubertin A.M., de Monte M., Faraj A., Sommadossi J.P., Perigaud C., Imbach J.L., Gosselin G. // *Antivir. Chem. Chemother.* 1998. V. 9. P. 41–52.
6. Jasko M., Shipitsin A., Shirokova E., Krayevsky A., Polsky B., Baron P., MacLow C., Ostrander M., O'Hara B. // *Nucleosides Nucleotides*. 1993. V. 12. P. 879–893.
7. Campbell D.A. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 6331–6335.
8. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Karpenko I.L., Zakirova N.F., Tarussova N.B., Krayevsky A.A. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2000. V. 19. P. 1795–1804.
9. Noren J.O., Helgstrand E., Johansson N.G., Misiorny A., Stening G. // *J. Med. Chem.* 1983. V. 26. P. 264–270.
10. *Methods in Molecular Medicine. Antiviral Methods and Protocols* / Eds Kinchington D., Schinazi R.F. N.Y.: Humana Press, 2000. P. 242–243.
11. Свинарчик Ф.П., Коневец Д.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г., Власов В.В. // *БИОХИМИЯ*. 1993. Т. 75. С. 49–54.

New Phosphonofornic Acid Derivatives of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine

E. A. Shirokova[#], M. V. Jasko^{*}, A. L. Khandazhinskaya^{*}, A. V. Ivanov^{*},
D. V. Yanvarev^{*}, Yu. S. Skoblov^{*}, T. R. Pronayeva^{**},
N. V. Fedyuk^{**}, A. G. Pokrovsky^{**}, and M. K. Kukhanova^{*}

[#] Phone: +7 (095) 135-6065, fax: +7 (095) 135-1405, e-mail: shirokova-elena@list.ru

^{*} Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

^{**} Vector State Research Center of Virology and Biotechnology,
Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

New 5'-alkyl ethoxy- and aminocarbonylphosphonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) were synthesized, and their antiviral properties in HIV-1-infected cell cultures and stability to chemical hydrolysis were studied. The AZT 5'-aminocarbonylphosphonates were shown to be significantly more stable in phosphate buffer (pH 7.2) than the corresponding ethoxycarbonylphosphonates. The therapeutic (selectivity) index of some of the compounds exceeded that of the parent AZT due to their higher antiviral activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 3'-azido-3'-deoxythymidine, human immunodeficiency virus, nucleoside phosphonates