

ХАНДАЖИНСКАЯ АНАСТАСИЯ ЛЬВОВНА

НОВЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ
АНТИВИРУСНЫХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ

1.5.3 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва 2022

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 консультант: доктор химических наук, академик РАН
Сергей Николаевич Кочетков

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Официальные оппоненты: доктор химических наук, член-корреспондент РАН
Дмитрий Владимирович Пышный
директор Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

доктор химических наук
Татьяна Семеновна Орецкая
ведущий научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

доктор химических наук
Александр Петрович Каплун
профессор кафедры химии и технологии биологически
активных соединений, медицинской и органической химии
имени Н.А. Преображенского (ХТБАСиМХ)
Института тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова
в составе МИРЭА РТУ

Ведущая организация: ФГБУ науки Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится «28» апреля 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного Совета 24.1.081.01 (Д 002.235.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук 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 по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://eimb.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Анашкина А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из основных задач современной науки является создание новых эффективных препаратов, направленных на лечение заболеваний, с которыми приходится сталкиваться человечеству. За последние несколько десятков лет синтезировано множество веществ с различными механизмами действия, которые с успехом применяются для профилактики и лечения болезней, ранее не поддававшихся лекарственной терапии. Однако возникновение новых лекарственно-устойчивых форм изученных патогенов и развитие новых, в первую очередь вирусных, заболеваний вызывают необходимость создания современных эффективных препаратов с улучшенными свойствами. Существуют разные стратегии решения данной задачи. Первая состоит в непрерывном интенсивном поиске новых химиотерапевтических агентов: соединений, сочетающих высокую активность в отношении определенного патогена, отсутствие токсичности для организма человека, приемлемые фармакокинетические параметры и т.п. В рамках данной стратегии используют как методы рационального дизайна молекул, направленных на определенные ферменты-мишени, так и тотальный скрининг библиотек соединений в отношении широкого круга патогенов. Другая стратегия подразумевает улучшение свойств существующих агентов путем создания депо-форм, «продрагов» или «со-лекарств». Эти методы позволяют повысить эффективность агента за счет оптимизации растворимости, биодоступности и других фармакокинетических параметров, снизить токсичность и кратность приема препарата и т.п.

Мы использовали обе стратегии, работа состоит из двух частей. Первая из них включает дизайн и синтез новых нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1, а также ненуклеозидных ингибиторов ВИЧ-1 и сопутствующих бактериальных инфекций, на основе 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. Вторая часть работы посвящена созданию новых типов депо-форм различных ингибиторов ВИЧ-1 и сопутствующих вирусных инфекций.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось создание новых аналогов нуклеозидов для ингибирования вирусных и бактериальных мишеней и выявление соединений-лидеров, перспективных для создания новых лекарственных средств для терапии инфекционных заболеваний. В качестве основной мишени выступала обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека типа 1.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

- разработать методы синтеза новых соединений на основе 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов;
- исследовать влияние полученных соединений на активность соответствующих ферментов и на развитие патогена в культуре клеток;
- исследовать зависимость биологической активности полученных соединений от типа и положения введенных заместителей;
- разработать методы синтеза новых типов депо-форм нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ;
- оценить эффективность новых депо-форм.

Научная новизна. Разработаны методы синтеза новых динуклеозидолигофосфонатов 5'-норкарбоциклических аналогов пуриновых нуклеозидов, способных как самостоятельно ингибировать синтез ДНК, катализируемый ОТ ВИЧ, так и гидролизаться до соответствующих трифосфонатов, также являющихся эффективными терминаторными субстратами ОТ ВИЧ.

Предложены методы синтеза группы производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, несущих модификации по 3-, 5-, 6- и/или 4'-положениям молекулы. Синтезирован, выделен и охарактеризован 61 новый представитель класса 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. Впервые показана способность этих соединений выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1 дикого типа, а также ее мутантной формы, соответствующей штамму ВИЧ-1, резистентному к ННИОТ первого поколения. С помощью компьютерного моделирования постулировано связывание наиболее перспективных соединений в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1. Проведен анализ зависимости биологической активности от структуры синтезированных веществ; выявлены базовые соединения, а именно 1-(4'-(3,5-диметилбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил, 1-(4'-(3,5-дихлорбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил и 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил, являющиеся перспективными для последующих модификаций с целью увеличения активности и понижения токсичности разрабатываемых 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. Таким образом, впервые показано, что в зависимости от введенных модификаций 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов могут быть как нуклеотидными, так и ненуклеозидными ингибиторами ОТ ВИЧ-1.

Впервые показана способность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов эффективно ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), в том числе штамма с множественной лекарственной устойчивостью, а также рост ряда других бактерий и микроорганизмов. С помощью ферментативного разделения получены (+) и (-) изомеры 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацила и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадецилиурацила, полностью подавляющие рост *M.tuberculosis*

в концентрации 5-40 мкг/мл. Методом просвечивающей электронной микроскопии впервые показано, что процесс ингибирования роста клеток *M.tuberculosis* H37Rv сопровождается накоплением липидных внутриклеточных вакуольподобных включений в клетках, появлением глубоких выступов и углублений на поверхности, частичным и / или полным разрушением трехслойной оболочки клетки.

Синтезирована 51 новая потенциальная депо-форма НИОТ ВИЧ-1, основанная на 5'-фосфонатной модификации AZT или d₄T. Проведена оценка их стабильности, антивирусной активности и цитотоксичности. По совокупности полученных данных в качестве соединения лидера был выбран 5'-аминокарбонилфосфонат AZT. Проведены доклинические испытания 5'-аминокарбонилфосфоната AZT, продемонстрировавшие пролонгацию его фармакологического действия по сравнению с AZT и меньшую токсичность. В настоящий момент 5'-аминокарбонилфосфонат AZT проходит 3 стадию клинических испытаний.

Осуществлен дизайн и синтез 8 депо-форм нового типа, представляющих собой гетеродимеры двух нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1 или нуклеозидного ингибитора ОТ ВИЧ-1 и ненуклеозидного ингибитора цитомегаловируса человека (HCMV), и высвобождающих в клетке оба активных компонента. Испытания, проведенные в культурах клеток и инфицированных тканях, подтвердили способность высвобождать активные антивирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз); показано отсутствие цитотоксичности и наличие заявленной противовирусной активности.

Теоретическая и практическая значимость. Создан новый класс ингибиторов, представляющих собой 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, связывающихся в гидрофобном центре ОТ ВИЧ-1 и эффективно подавляющих активность фермента. В ряду 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов выявлены соединения-лидеры, которые могут в дальнейшем служить основой для разработки новых анти-ВИЧ препаратов – ненуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ.

Разработаны способы модификации пуриновых и пиримидиновых 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. Обнаружено, что 5-алкинильные производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила эффективны против возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*, в том числе против штамма MS-115, устойчивого к пяти применяемым в терапии лекарственным средствам.

Осуществлен дизайн и синтез 59 депо-форм нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ нового типа, проведены доклинические испытания одного из этих соединений – 5'-

аминокарбонилфосфоната AZT, проходящего в настоящее время 3-ю фазу клинических испытаний.

Методология и методы исследования. Создание прототипов лекарственных препаратов требует применения всего арсенала современных методов молекулярной биологии и биоорганической химии. В последние десятилетия предложен ряд принципиально новых, т.н. постгеномных технологий для создания таких препаратов. Однако не менее актуальными и, зачастую, основными, остаются и «классические» подходы, в первую очередь рациональный дизайн и синтез биологически активных соединений. Общий прогресс науки, главным образом развитие информационных технологий, внес значительные изменения в методологию. На сегодняшний день органический синтез часто направлен на создание строго определенных молекулярных конструкций, обладающих специфической активностью. Одной из областей применения органического синтеза с целью прикладного использования является медицинская химия.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны методы синтеза группы новых 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов, несущих модификации по 3-, 5-, 6- и/или 4'-положениям молекулы. Впервые показана способность этих соединений выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1.
2. Впервые показана способность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов эффективно ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе штамма с множественной лекарственной устойчивостью, а также рост ряда других бактерий и микроорганизмов.
3. Осуществлен дизайн и синтез новых депо-форм нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ, проведены доклинические испытания одного из соединений – 5'-аминокарбонилфосфоната AZT.
4. Созданы депо-формы нового типа, представляющие собой гетеродимеры ингибиторов ОТ ВИЧ-1 и сопутствующего HCMV, способные высвобождать в инфицированной клетке два активных антивирусных компонента.

Степень достоверности результатов. В работе использовали современные методы органической химии, молекулярной биологии, биохимии и фармакологии. Работа проведена с использованием реактивов ведущих российских и международных производителей и оборудования, соответствующего международным стандартам. Структура полученных соединений доказана современными физико-химическими методами анализа – ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, УФ - спектроскопия и др.

Препараты ферментов были получены из коммерческих источников или выделены в гомогенном состоянии по апробированным ранее методикам. Культуры клеток происходили из международных коллекций и были дополнительно проверены на контаминацию микоплазмой. Результаты биохимических экспериментов статистически достоверны.

Публикации. Все результаты, представленные в диссертационной работе, опубликованы в рецензируемых журналах, входящих в международные базы данных. По материалам диссертации опубликовано 36 печатных работ: 1 глава в книге и 35 статей в ведущих российских и зарубежных рецензируемых журналах, из них 5 обзоров. Получено 8 патентов. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на многочисленных международных конференциях.

Объем диссертации. Диссертация изложена на 260 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части и выводов. Материал иллюстрирован 26 таблицами, 67 рисунками и 54 схемами. Список цитированной литературы включает 330 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (Программа «Молекулярная и клеточная биология») и Российского фонда фундаментальных исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов как НИОТ и ННИОТ ВИЧ

Нуклеозидные аналоги, в которых кольцо тетрагидрофурана заменено цикlopентаном, называют карбоциклическими аналогами нуклеозидов [1]. В отличие от истинных нуклеозидов, содержащих остаток рибозы или 2'-дезоксирибозы, связанный с гетероциклическим основанием, в соединениях этого класса отсутствует гликозидная связь (Рис. 1). Эта замена придает устойчивость С-Н связи, которая в природных нуклеозидах лабильна и чувствительна к расщеплению нуклеозид-фосфорилазами и гидролазами. Конформационное сходство между цикlopентановым кольцом и тетрагидрофураном позволяет карбоциклическим нуклеозидным аналогам функционировать как субстраты/ингибиторы ферментов, катализирующих синтез и превращения природных нуклеозидов и нуклеотидов. Не содержащие углерода в 5'-положении производные цикlopентена были синтезированы в 1987-1990 годах группами Борчардта, Шнеллера и Троста и получили название 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов [2] (Рис. 1).

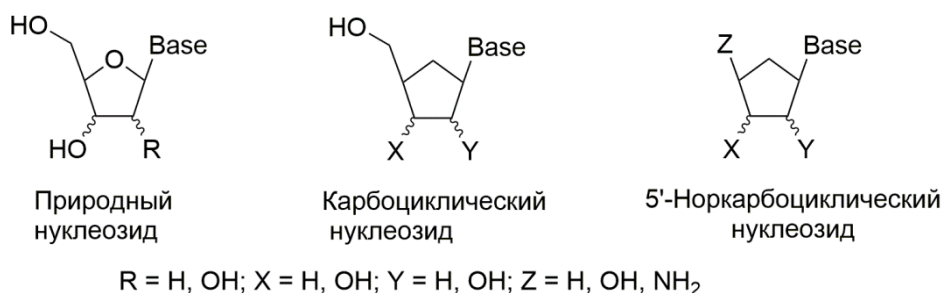


Рисунок 1. Особенности структуры нуклеозидов и их карбоциклических аналогов

Такая структурная особенность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов, как отсутствие 5'-метиленовой группы приводит к невозможности превращаться в фосфорилированные формы под действием клеточных ферментов. Это полезно при изучении механизма действия соединений, поскольку позволяет определить необходимость внутриклеточного фосфорилирования для реализации биологического эффекта препарата и исключить некоторые мишени, традиционные для обычных модифицированных нуклеозидов [2].

В первой части работы представлен синтез нескольких новых групп 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов и продемонстрирована их способность выступать как в качестве НИОТ, так и ННИОТ ОТ ВИЧ. Кроме того, данные соединения обладают также активностью против *M. tuberculosis*, возбудителя наиболее опасной и часто встречающейся из сопутствующих инфекций - туберкулеза.

1.1. Динуклеозидтетрафосфонаты, динуклеозиддифосфонатдифосфаты и динуклеозиддифосфонатфосфаты 5'-норкарбоциклических аналогов пуриновых нуклеозидов как НИОТ ВИЧ

Антивирусное действие нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ ВИЧ) возможно лишь после их внутриклеточного превращения в соответствующие 5'-трифосфаты. Актуально создание таких НИОТ ВИЧ, которые, не нуждаясь в предварительной внутриклеточной "активации", смогут сразу после проникновения в клетку останавливать процесс репликации вируса.

Ранее было показано, что модифицированные трифосфаты карбоциклических аналогов нуклеозидов являются эффективными терминаторными субстратами ОТ ВИЧ в бесклеточной системе и гораздо более стабильны в сыворотке крови человека, чем природные субстраты этого фермента. Однако в ходе экспериментов с клетками такие трифосфонаты показали низкую антивирусную активность, что связано с недостаточным уровнем проникновения в клетки. В то же время нуклеозид-5'-трифосфаты по данным ТСХ и ВЭЖХ анализа являются значительно более полярными соединениями, чем

соответствующие динуклеозид-5',5''-тетрафосфаты. Мы предположили, что модификация Р-γ положения карбоциклических нуклеозид-5'-трифосфонатов путем введения второго нуклеотидного фрагмента понизит полярность этих соединений, что будет способствовать их проникновению в клетки. В данном разделе представлены неизвестные ранее карбонуклеозидтри- и тетрафосфонаты (Рис.2), синтезированные на основе 5'-норкарбоциклических аналогов аденозина и гуанозина, исследование их стабильности и свойств в качестве терминаторных субстратов ОТ ВИЧ, а также антивирусной активности в клеточных культурах, инфицированных ВИЧ [3].

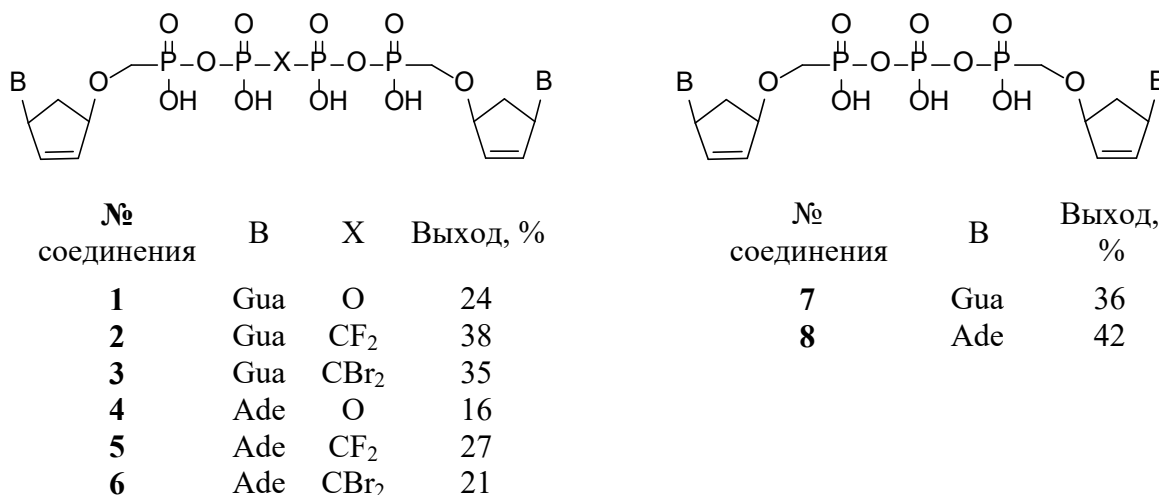


Рисунок 2. Структуры динуклеозидолигофосфонатов 1-8.

Устойчивость к действию дефосфорилирующих ферментов плазмы крови является важной характеристикой антивирусных агентов нуклеотидной природы. Мы изучили устойчивость карбоциклических динуклеозидтетрафосфонатов в пуповинной сыворотке крови человека на примере соединений 1 и 2. Пуповинная сыворотка крови человека была использована в качестве модели биологически активной среды, богатой дефосфорилирующими и гидролизующими ферментами.

Из рисунка 3 видно, что соединение 2 гидролизруется с образованием двух продуктов – монофосфоната 9 и трифосфоната 10, при этом в течение первых трех часов накопление обоих продуктов происходит с одинаковой скоростью. Через 4 часа скорость гидролиза трифосфоната становится сравнимой со скоростью его образования, количество

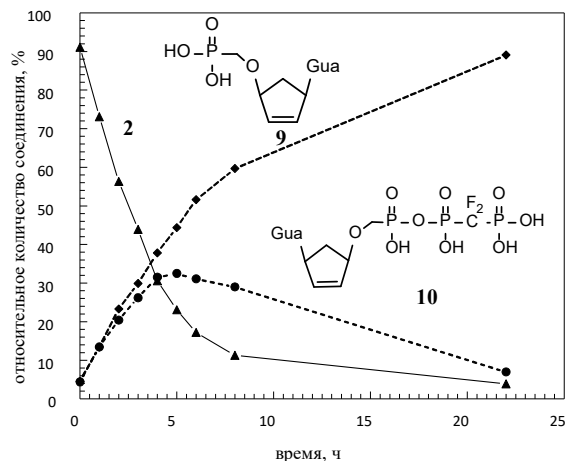


Рисунок 3. Гидролиз соединения 2 в пуповинной сыворотке крови человека.

трифосфоната в течение последующих 2-3 часов остается на одном уровне, а затем медленно уменьшается. Напротив, количество монофосфоната в реакционной смеси постоянно возрастает и через 22 часа он является практически единственным продуктом. Гидролиз соединения **1** протекает аналогично. Интересно, что, несмотря на различную структуру β,β' -фрагментов, соединения **1** и **2** гидролизуются с одинаковой скоростью и дают однотипные продукты. На основе ВЭЖХ анализа соотношения исходных соединений и образовавшихся продуктов были построены кривые скорости гидролиза и определено время гидролиза половинного количества соединений **1** (3 ± 0.3 ч) и **2** (3 ± 0.3 ч) по сравнению с контрольными трифосфонатом **10** (7 ± 0.5 ч) и **dGTP** (0.3 ± 0.03). Таким образом, синтезированные нами динуклеозидолигофосфонаты при гидролизе в сыворотке крови образуют соответствующие трифосфонаты со скоростью, позволяющей рассматривать эти динуклеозидолигофосфонаты в качестве потенциальных депо-форм [3].

Синтезированные соединения были исследованы в экспериментах по ингибированию синтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ в бесклеточных системах (работа проведена к.б.н. Л. С. Викторовой, ИМБ РАН) [3, 4]. Все они проявили свойства терминаторных субстратов и встраивались в растущую цепь ДНК, после чего синтез ДНК останавливался. Наиболее активными оказались соединения с β,β' -пирофосфатной вставкой **1** и **4** с IC_{50} 0.7 и 2.0 мкМ, соответственно. Их субстратная активность оказалась близка к таковой для природных субстратов dATP и dGTP. Введение β -фосфатного (соединения **7** и **8**) или β,β' -диформетилendifосфонового фрагмента (соединения **2** и **5**) понижало активность примерно на порядок, IC_{50} 8-20 мкМ. Дибромметилен-содержащие соединения **3** и **6** были практически неактивны. Для всех полученных соединений эффективность ингибирования синтеза ДНК соответствовала их субстратной активности. Следует отметить, что в экспериментах в бесклеточных системах синтезированные динуклеозидные производные не показали явных преимуществ перед соответствующими трифосфонатами.

Синтезированные динуклеозидолигофосфонаты были испытаны на клетках Rat1, инфицированных рекомбинантным ретровирусом (pSG1), содержащим ген обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии (MLV) (работа проведена к.х.н. Л.Е. Горюновой, Институт экспериментальной кардиологии, Всероссийский кардиологический центр, РАМН). Противовирусная активность динуклеозидолигофосфонатов была на порядок выше, чем активность соответствующих трифосфонатов, но на два порядка ниже, чем активность контрольного AZT [3, 4].

В вирусологических испытаниях на клетках МТ-4, инфицированных ВИЧ, проведенных в лаборатории проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск), синтезированные динуклеозидолигофосфонаты также проявили невысокую анти-ВИЧ активность. Использование в опытах липосом для доставки этих соединений в клетку привело к повышению их активности, что свидетельствует о том, что одной из причин малой эффективности в клеточных культурах является их плохое проникновение через клеточные мембраны [3].

Таким образом, синтезированные нами динуклеозидолигофосфонаты при гидролизе в сыворотке крови образуют соответствующие трифосфонаты, которые являются эффективными терминаторными субстратами обратной транскриптазы ВИЧ [3, 4]. Более того, динуклеозидолигофосфонаты способны сами ингибировать синтез ДНК, катализируемый ОТ ВИЧ или теломеразой [3-5]. Однако динуклеозидолигофосфонаты не могут быть признаны оптимальными депо-формами соответствующих трифосфонатов, так как плохо проникают через клеточные мембраны. Введение в молекулу трифосфоната второго нуклеотидного остатка хотя и приводит к понижению полярности, но не является достаточным условием для эффективного проникновения соединений в клетки.

1.2. Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила

Второй раздел данной части диссертационной работы посвящен синтезу 5'-норкарбоциклических производных урацила. Карбоциклическим фрагментом здесь, как и в предыдущей части, служит гидроксициклопентен. Проанализировав биологические свойства различных нуклеозидных производных пиримидинового ряда, мы выбрали несколько типов модификаций молекулы 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила **11**. Целевые соединения были синтезированы и изучены в качестве антивирусных и/или антибактериальных агентов.

1.2.1. Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенные по 4'-, 3-, 6- положениям. Синтез и оценка анти-ВИЧ активности

В отличие от описанных в предыдущем разделе три- и тетрафосфонатов 5'-норкарбоциклических аналогов пуриновых нуклеозидов, производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила были созданы как потенциальные ННИОТ ВИЧ.

На сегодняшний день существует около 50 классов ННИОТ различной химической природы, однако исследователи продолжают синтезировать новые типы соединений, способных эффективно связываться в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1, для создания препаратов с улучшенными фармакологическими и антивирусными свойствами [6-9].

Для изучения ингибиторных свойств 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов по отношению к ОТ ВИЧ-1 была получена серия соединений, содержащих 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацил **11** или 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацил **12** в составе триароматической системы (Рис.4) [10]. Синтезированные соединения различались заместителями бензильного остатка в 3-ем положении гетероциклического основания, которые были выбраны на основании анализа структур ННИОТ и их фрагментов, которые способствовали связыванию субстрата в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1.

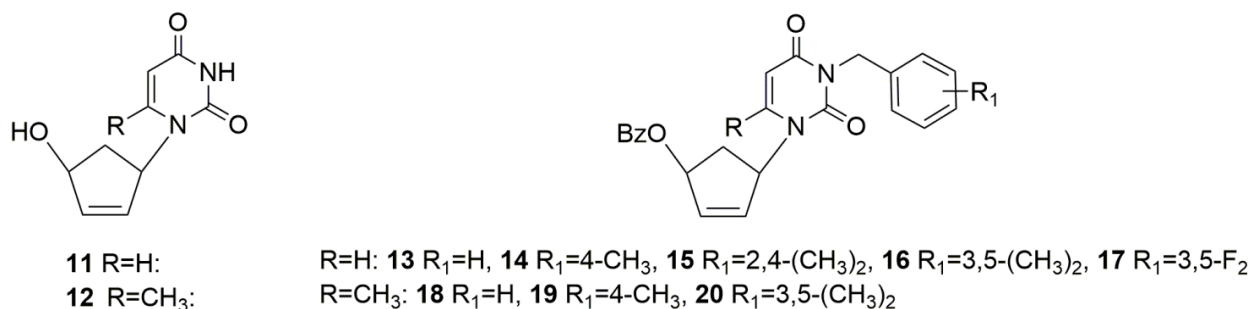


Рисунок 4. 3-Замещенные производные 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)урацила

Соединения **11-20** были оценены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1. Лучшую активность показали соединения **13** и **14** которые ингибировали ОТ ВИЧ-1 дикого типа с константами ингибирования (K_i) 13.4 и 18.7 мкМ соответственно [10]. Было показано, что активность соединений **13** и **14** в отношении мутантной формы ОТ ВИЧ-1, несущей замену лейцина на изолейцин (L100I), была примерно на порядок выше, чем против фермента вируса дикого типа. Величины K_i для них составили 1.2 и 2.4 мкМ соответственно. Полученные данные впервые показали, что 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов могут выступать как ННИОТ ВИЧ-1, причем ингибирующая активность в отношении фермента, несущего мутацию L100I, на порядок выше, чем против фермента вируса дикого типа [10].

Для оценки зависимости активности от структуры были синтезированы и оценены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1 соединения **21-34** с различными заместителями ароматических фрагментов и линкерами разной длины (Рис.5) [11]. В зависимости от типа заместителя, константа ингибирования фермента, соответствующего дикому штамму вируса составляла от 5 до 60 мкМ [11]. Наиболее перспективные соединения **13**, **14**, **29** и **30** были дополнительно изучены на мутантных формах ОТ ВИЧ, соответствующих наиболее широко распространенным резистентным штаммам вируса (Таблица 1). Следует отметить, что активность соединений в отношении мутантной формы ОТ ВИЧ-1, несущей замену лейцина на изолейцин (L100I), была примерно на порядок выше (K_i 1.2-2.4 мкМ), чем против фермента вируса дикого типа, что может быть полезно при разработке новых

препаратов для преодоления резистентности. Анализ зависимости ингибиторной активности от структуры полученных соединений выявил ряд закономерностей. Максимальная способность ингибировать ОТ ВИЧ-1 была отмечена при отсутствии метильных групп в N-3 бензильном остатке (соед. **13**, **29**, **30**) или наличии одной в *para* положении (соед. **14**). Наличие заместителей в 2,4- или 3,5- положениях N-3 бензильного остатка (соед. **15-17**) снижает величину K_i примерно в 10 раз. Присутствие метильной группы в 6-ом положении основания (соед. **18-20**) приводит к потере ингибиторной активности.

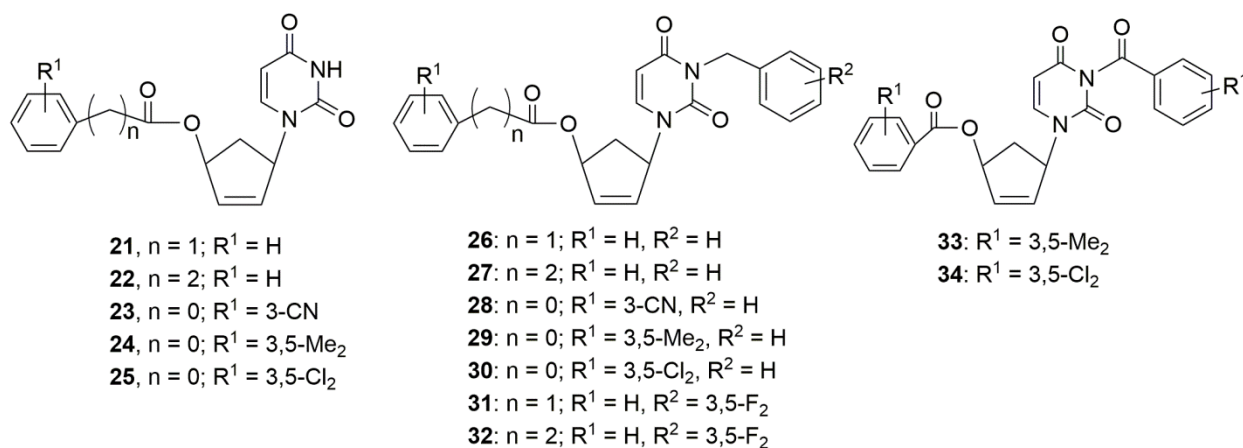


Рисунок 5. Структура соединений **21-34**

Таблица 1. Активность соединений в отношении выделенных мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса

Форма ОТ	13	14	29	30	невирапин
	K_i , мкМ				
WT	13.4	18.7	8.2	5.1	7.2
L100I	1.2	2.4	2.1	1.3	273
K103N	33.6	55.4	17.3	8.8	>2000
V106A	>50	>50	>20	>10	>2000
Y181C	>50	>50	>20	>10	>2000
G190A	>50	>50	>>100	>>100	>2000
K103N / Y181C	>50	>50	>20	>10	>2000

Таким образом, впервые было показано, что новые аналоги карбоциклического 5'-норуридина способны ингибировать ОТ ВИЧ-1 посредством связывания в гидрофобном «кармане» фермента [10-12]. Данные компьютерного анализа (работа проведена Д.А. Бабковым, ВолгМУ) позволяют сделать вывод о предпочтительных местах модификации молекулы 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентенил)урацила, что существенно для дальнейших разработок ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ [10-12].

Биологическая активность соединений, описанных в данном разделе, была дополнительно исследована в отношении широкого круга патогенов. Соединения **16**, **20** и

29 проявили выраженные ингибирующие свойства против *Trypanosoma brucei* [13], простейших паразитов, которые вызывают спектр тропических болезней у людей и животных.

1.2.2. 5-Ариламинопроизводные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила.

Синтез и оценка анти-ВИЧ и противотуберкулезной активности

Данные литературы свидетельствуют, что введение различных группировок в 5-ое положение пиримидинового кольца привело к огромному числу соединений с цитостатической или антивирусной активностью. Это объясняется уникальностью 5-ого атома углерода ароматической пиримидиновой системы, по которому легко протекают разнообразные химические и ферментативные реакции электрофильного замещения. Нами было показано наличие активности против ВИЧ-1 и EBV у 1-бензил производных 5-ариламиноурацила [14]. С целью создания новых биологически активных карбоциклических пиримидиновых нуклеозидов осуществлен дизайн и синтез группы оригинальных 5-ариламинопроизводных 5'-норкарбоциклического 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина (Рис. 6) [12, 15-17].

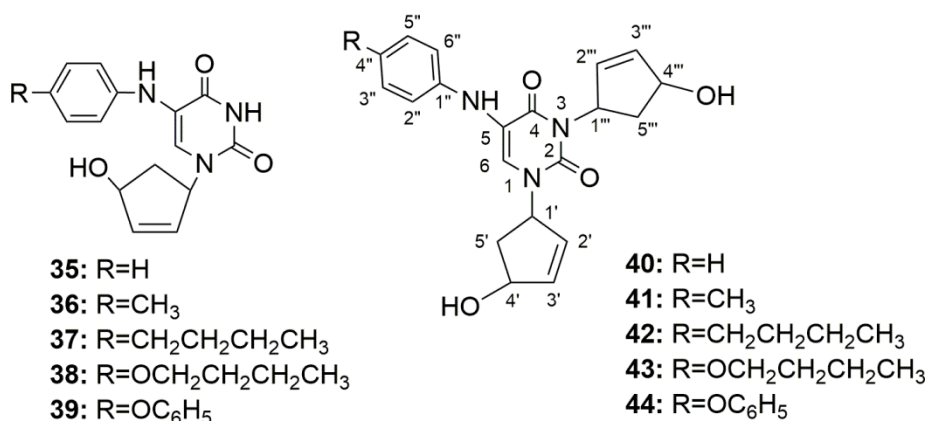


Рисунок 6. Структура соединений **35-44**

Конденсация 5-ариламинопроизводных урацила, которые были нам любезно предоставлены коллегами из Волгоградского государственного медицинского университета, с эпокси-циклопентеном позволила получить соединения **35-39**. В случае применения избытка эпокси-циклопентена выход целевых соединений **35-39** возрастал до 35-49%, также получали продукты бисприсоединения эпокси-циклопентена **40-44** с выходом 35-39%.

Полученные соединения были изучены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1, но не показали активности ($K_i \gg 200$ мкМ) и только производное **39** ингибировало фермент в концентрации 119 мкМ [12, 17].

В ходе систематических исследований ряда производных пиримидинов у многих из них были обнаружены выраженные антибактериальные свойства [15]. Полученные

производные **35-44** были переданы в Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза РАМН для изучения противотуберкулезной активности. Оказалось, что соединения **39**, **41** и **43** способны влиять на активное деление микобактериальных клеток. Полное ингибирование роста лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv веществами **39**, **41** и **43** наблюдалось в концентрации 20-40 мкг/мл, а значения МИК₉₀ в отношении штамма *M. tuberculosis* MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью, резистентного к действию препаратов первого ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и пиразинамид), составили 5 мкг/мл для соединения **43** и 20 мкг/мл для соединения **41** [16, 17].

Цитотоксичность синтезированных соединений изучали методом МТТ на культуре клеток *Vero*. Соединения **35-44** не проявляли токсичности вплоть до концентрации 250 мкМ.

Таким образом, 5-ариламинопроизводные 5'-норкарбоциклического 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина не показали заметной анти-ВИЧ активности, однако соединение **39** все же обладает определенным сродством к ОТ ВИЧ-1, K_i для него составляет 119 мкМ. Неизвестные ранее 5-ариламинопроизводные 5'-норкарбоциклического 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина продемонстрировали способность ингибировать рост *M. tuberculosis*. Структурное подобие соединений такого типа высокоактивным ННИОТ ВИЧ, в сочетании с выраженной противотуберкулезной активностью делают их интересными для дальнейших модификаций.

1.2.3. Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенные по 5 положению. Синтез и оценка противотуберкулезной активности.

На сегодняшний день туберкулез является главной причиной заболеваемости и смертности в мире. На это влияет ряд факторов, один из них - возникновение штаммов микобактерий, резистентных к используемой химиотерапии. Особо следует отметить штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и суперустойчивостью, на которые стандартные методы лечения не действуют. Важную проблему представляет собой смертельная комбинация туберкулеза и вируса иммунодефицита человека. Совокупность этих факторов делает необходимым поиск новых противотуберкулезных агентов. Предполагается, что они будут работать по новому механизму, отличному от такового для уже используемых в лечении препаратов, с целью предотвращения возникновения кросс-резистентности. Внимание уделяют не только новым антибиотикам, но и лекарственным веществам другой природы, имеющим иные механизмы действия.

Этот раздел диссертационной работы является продолжением предыдущего и посвящен синтезу новых 5-замещенных производных урацила, содержащих гидроксциклопентен вместо углеводного фрагмента [18]. Неизвестные ранее 5-алкинильные производные 5'-норкарбоциклического аналога 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина были получены с использованием Pd-катализируемых реакций кросс-сочетания, которые на данный момент являются одним из наиболее эффективных методов создания новой углерод-углеродной связи. Исходным соединением в этих синтезах был неописанный ранее карбоциклический нуклеозид 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил **45**, который получали конденсацией Троста, исходя из 5-йодурацила и эпоксициклопентена. Далее йод в соединении **45** замещали на алкинильные радикалы реакцией кросс-сочетания Соногаширы в присутствии каталитического количества $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ и йодида меди (CuI) (Схема 1).

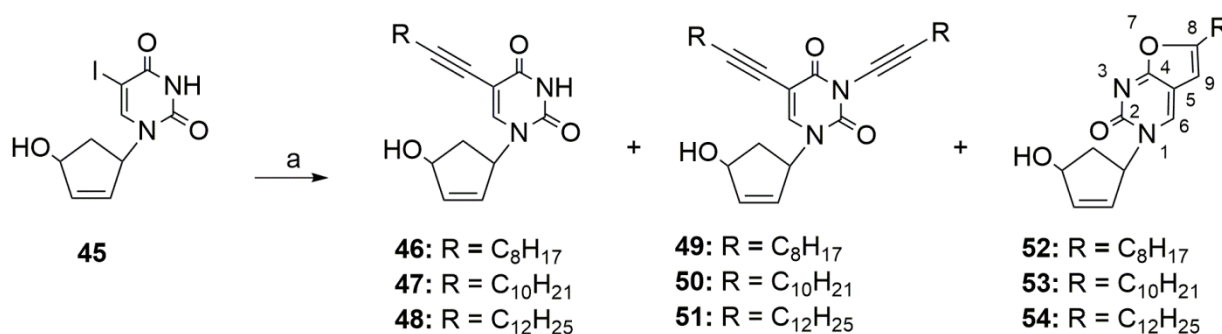


Схема 1. (a) $\text{HC}\equiv\text{CR}$, CuI , $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, ДМФА

Помимо целевых 5-алкинил замещенных производных **46-48**, из реакционной массы были выделены продукты 3,5-бис присоединения **49-51**, а также бициклические соединения **52-54** (Схема 1), которые также были охарактеризованы [18]. Выход продуктов **46-48** составлял 24-32%, продуктов 3,5-бис присоединения **49-51** и бициклических соединений **52-54** – 16-17% и 13-15% соответственно. В ^1H -ЯМР спектрах целевых продуктов имелись все сигналы, характерные для 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, а также сигналы протяженных алкинильных заместителей в области 1-3 м.д.

Побочные продукты заметно отличались по спектру поглощения в ультрафиолете, характерное свечение можно было наблюдать на ТСХ пластинках. В УФ-спектрах для продуктов **46-48** максимум поглощения наблюдался при λ 296-297 нм, тогда как соединения **49-51** имели максимум поглощения при λ 340-345 нм. Для фуropyримидинов **52-54** показаны два максимума поглощения: в ближнем (λ 245-246 нм) и дальнем (λ 335-336 нм) диапазонах длин волн.

Таким образом, получены неизвестные ранее 5-алкинил замещенные производные 5'-норкарбоциклического аналога 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина, продукты 3,5-

бис-присоединения, а также бициклические соединения, противотуберкулезная активность некоторых из веществ этих групп представлена ниже (Таблица 2)[18]. Впоследствии были синтезированы и другие бициклические пирроло- и фурано[2,3-d]пиримидины с разными заместителями в гетероциклическом кольце, некоторые из них проявили ингибирующую активность по отношению к ряду опухолевых клеток с умеренным значением индекса селективности [19].

Кроме описанных выше 5-алкинильных производных 5'-норкарбоциклического аналога 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина нами были получены еще две новые группы соединений с заместителями по 5 положению урацила, несущие алкилоксиметильные (соединения **55-60**) и алкилтриазилидометильные (соединения **61-66**) остатки (Схема 2) [20].

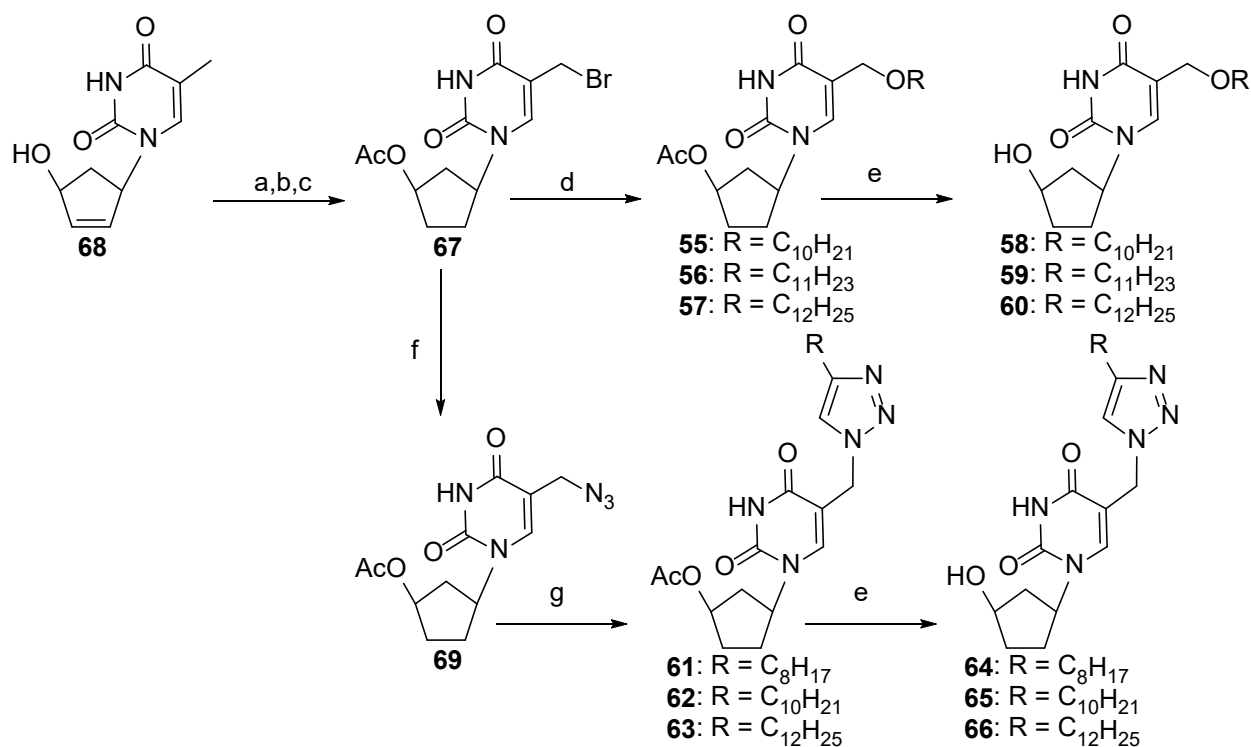


Схема 2. (a) Pd/C, H₂, MeOH; (b) Ac₂O, Py; (c) Br₂, дихлорэтан, *hν*, 83°C; (d) ROH; (e) K₂CO₃, MeOH; (f) NaN₃, ДМФА, 40°C; (g) RC≡CH, CuSO₄·5H₂O, аскорбинат натрия, CH₂Cl₂/H₂O (1:1)

Ключевым промежуточным соединением для синтеза обеих групп новых 5-модифицированных 5'-норкарбоциклических аналогов был 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацил **67** (схема 2). Его синтезировали в три стадии: гидрирование двойной связи соединения **68** в присутствии палладия на угле и последующее ацетилирование приводили к образованию 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)тимина, который подвергали радикальному бромированию по методу Барвольфа и Лангена. Ацетилированные 5-алкилоксиметилзамещенные производные **55-57** получали путем реакции бромида **67** с

соответствующим первичным спиртом, а последующее снятие защиты с 4'-гидроксигруппы приводило к соединениям **58-60**.

5-Алкилтриазиолометильные производные **61-66** синтезировали по методу Ли. Азидирование 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацила **67** до 5-метилазида **69** с последующим 1,3-диполярным циклоприсоединением соответствующего олефина в двухфазной системе хлористый метилен-вода при катализе Cu (I), полученной *in situ* из сульфата меди и аскорбината натрия, давало соединения **61-63**; после удаления ацетильного остатка с 4'-гидроксигруппы получали целевые 5-алкилтриазиолометильные производные **64-66**.

Изучение влияния соединений **45-48** и **55-66** на рост лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv проводили с помощью автоматической системы детекции роста Bactec MGIT 960 в Центральном научно-исследовательском институте туберкулёза РАМН. Антимикобактериальная активность в системе *in vitro* была показана для всех тестируемых соединений [18, 20]. Минимальные концентрации (MIC₉₉), при которых происходит подавление роста не менее 99% бактериальной популяции штамма H37Rv для наиболее активных соединений представлены в таблице 2.

Таблица 2. Противотуберкулезная активность и цитотоксичность 5'-норкарбоциклических производных 5-замещенного урацила

Соединение	<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv) MIC ₉₉ ^a (мкг/мл)	CD ₅₀ /линия клеток (мкг/мл)
(±)- 45	20	>200 /Vero
(±)- 46	40	>125 /Vero
(±)- 47	20	>125 /Vero
(±)- 48	10	125 /Vero
(±)- 57	20	20.6 / U-937
(±)- 61	50	23.7 / U-937
(±)- 62	50	15.1 / U-937
рифампицин	1	>500

^a концентрация препарата ингибирующая рост микобактерий на 99%

Показано, что антимикобактериальная активность соединений **46-48** зависит от длины заместителя в 5-положении: величина MIC₉₉ уменьшается в ряду 5-децинил > 5-додэцинил > 5-тетрадецинил. Лучшей антимикобактериальной активностью среди 5-алкилоксиметильных производных **55-60** обладало соединение **57** с ацетильным остатком

по 4'-гидроксильной группе и метилоксидодецильным заместителем по 5 положению урацила. В ряду 5-алкилтриазолидометильных производных **61-66** значительный ингибирующий эффект продемонстрировали 4'-ацетилированные аналоги **61** (5-октилтриазолидометил) и **62** (5-децилтриазолидометил). Необходимо отметить, что в отличие от 5-алкинил замещенных соединений, 5-алкоксиметильные и 5-алкилтриазолидометильные производные оказались довольно токсичными для клеток. Наилучшую ингибирующую концентрацию в отношении *M. tuberculosis* (H37Rv) в сочетании с низкой токсичностью продемонстрировало соединение **48**, содержащее тетрадецил в 5-ом положении гетероциклического основания, для него при концентрации 10 мкг/мл наблюдалось 100% ингибирование роста микобактерий.

Антибиотическую активность синтезированных соединений **55-66** дополнительно тестировали как на грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Mycobacterium smegmatis* mc²155, *Mycobacterium smegmatis* VKPM Ac 1339, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177) и грамотрицательных бактериях (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922). Некоторые соединения полностью ингибируют рост *M. smegmatis* (MIC₁₀₀ на штамме mc²155 для **57**, **58**, **62** и **65** – 67 мкг/мл; MIC₁₀₀ на штамме VKPM Ac 1339 для **57** и **58** – 67 мкг/мл, а для **62** и **65** – 6.7 мкг/мл), *M. tuberculosis* 25177 (MIC₁₀₀ для **57** – 55 мкг/мл, **62** – 29 мкг/мл, **65** – 52 мкг/мл, **61** – 54 мкг/мл, **63** – 61 мкг/мл, **64** – 97.5 мкг/мл, **66** – 56 мкг/мл) и *M. bovis* (MIC₁₀₀ для **57** – 55 мкг/мл, **62** – 57.5 мкг/мл, **65** – 100 мкг/мл, **61** – 54 мкг/мл). Тестирование проводилось О.В. Ефременковой в ФГБУН Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе и Карен Букхейт в ImQuest BioSciences [20].

Карбоциклические производные **45-48** и **55-66** были получены в виде рацемических смесей. Известно, что биологические свойства индивидуальных энантиомеров могут отличаться, поэтому рацемическую смесь наиболее активного соединения **48** разделили на энантиомеры с помощью переэтерификации в винилацетате с липазой Amano PS. Энантиомеры выделили и изучали их способность ингибировать рост *M. tuberculosis* [18]. Винилацетат в данном случае используется для обеспечения необратимости реакции. Процесс останавливали, по достижении 50% конверсии, липазу отделяли, продукты выделяли и очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле. В результате получили (+)-1-(4'-ацетокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил **(+)-70** и (-)-1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил **(-)-45** (Схема 3).

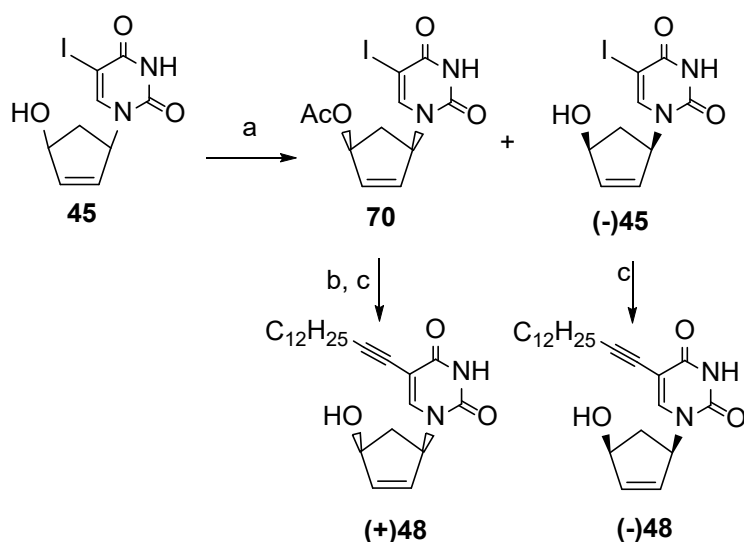


Схема 3. (a) Amano PS липаза, винилацетат; (b) K_2CO_3 , метанол; (c) $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, CuI , $\text{NEt}(\text{iPr})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, ДМФА

Ацетильную группу соединения **70** удаляли под действием K_2CO_3 в метаноле и далее проводили реакции замещения йода индивидуальных энантиомеров **(+)-45** и **(-)-45** на тетрадецинил по методу, описанному выше. Выходы продуктов **(+)-48** и **(-)-48** составили 46 и 49% соответственно. Неизвестные ранее изомеры **(+)-45**, **(-)-45**, **(+)-48** и **(-)-48** были охарактеризованы величинами углов вращения плоскополяризованного света $[\alpha]_D$ и с помощью кругового дихроизма (КД) [18].

Таблица 3. Влияние рацемической смеси и энантиомеров соединения **48** на рост лабораторного чувствительного и клинического МЛУ штаммов *M.tuberculosis*

Соединение	<i>M.tuberculosis</i> (H37Rv)		<i>M.tuberculosis</i> (MS-115)	
	% ингибирование ^a (конц. мкг/мл)	МІС ₉₉ ^b (мкг/мл)	% ингибирование ^a (конц. мкг/мл)	МІС ₉₉ ^b (мкг/мл)
(±)-48	100 (20), 99 (10)	10	100 (20, 10)	10
(+)-48	100 (20, 10), 25 (5)	10	100 (20), 99 (10)	10
(-)-48	100 (20, 10), 99 (5)	5	100 (20), 99 (10)	10
рифампицин	100 (1)	1	0 (1)	-
изониазид	100 (0,1)	0,1	0 (0,1)	-
офлоксацин	100 (2)	2	100 (2)	2

^a Антимикобактериальную активность определяли в конц. 40, 20, 10, 5 и 2,5 мкг/мл

^b Концентрация препарата ингибирующая рост микобактерий на 99%

Соединения **(±)-48**, **(+)-48** и **(-)-48** были переданы в НИИ туберкулеза РАМН для исследования на диком штамме *M.tuberculosis* H37Rv, а также на клиническом штамме

MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), резистентному к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и пиразинамиду (Табл. 3). На штамме H37Rv наибольшую активность показал изомер (-)-**48** с MIC₉₉ = 5 мкг/мл, тогда как на МЛУ штамме оба изомера и рацемическая смесь проявили одинаковую активность MIC₉₉=10 мкг/мл. MIC₉₉ в отношении клинического МЛУ-штамма *M.tuberculosis* MS-115 была также установлена для соединений **57** (20 мкг/мл), **61** (20 мкг/мл) и **62** (50 мкг/мл) [18].

Исследования морфологии бактериальных клеток *M.tuberculosis* H37Rv, обработанных аналогами **48** и **57** методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис. 7), показали, что процесс ингибирования роста клеток *M.tuberculosis* H37Rv сопровождается накоплением липидных внутриклеточных вакуольподобных включений в клетках, появлением глубоких выступов и углублений на поверхности, частичным и/или полным разрушением трехслойной оболочки клетки [21]. Точный молекулярный механизм действия 5-замещенных пиримидиновых нуклеозидов на клетки *M.tuberculosis* еще предстоит доказать. Однако можно предположить, что механизм действия этих соединений связан либо с их прямым воздействием на клеточные стенки бактерий, либо с влиянием на ферменты, участвующие в процессе формирования клеточной стенки.

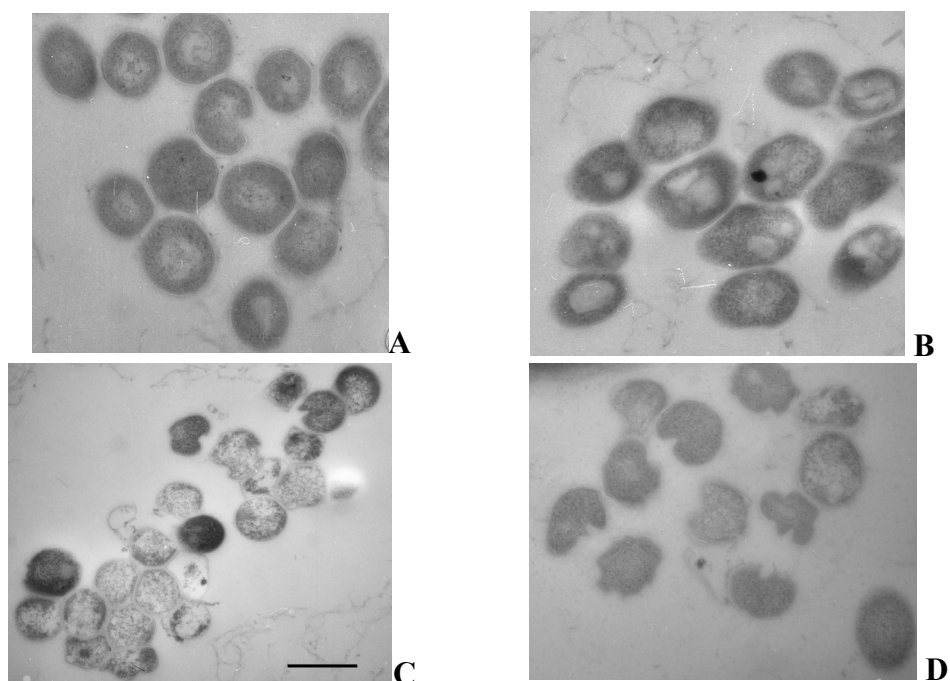


Рисунок 7. Электронные микрофотографии клеток *M.tuberculosis* H37Rv, выращенных в течение 4 дней в обогащенной среде Дюбуа (А), в присутствии буфера ДМСО / Twin-80 / H₂O без соединений (В) и с добавлением соединений **48** (С) и **57** (D) в концентрации 50 мкг/мл.

Заключение по разделу 1.

В результате работы мы получили несколько новых типов 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов и выявили неизвестные ранее биологические свойства соединений данного класса. Впервые показана способность ингибировать рост *M.tuberculosis* (новая мишень)[12, 16-18, 20-22] и связываться в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1 (новый механизм действия) [10-12, 23]. Благодаря применению методов органической химии, молекулярной биологии, компьютерного моделирования и структурно-функциональному анализу были определены наиболее активные соединения и направления модификаций, которые возможно позволят в дальнейшем улучшить биологическую активность созданных нами оригинальных 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов.

2. Депо-формы НИОТ ВИЧ

В настоящий момент группа нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ, одобренных управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA, USFDA) к терапевтической практике, включает пять препаратов: 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT, зидовудин, ретровир), (-)-β-*L*-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС, ламивудин), (-)-β-*L*-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин (L-FTC, эмрицитабин), (1*S*,4*R*)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)-9*H*-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанол (ABC, абакавир) и производные ([[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси]метил)фосфоновой кислоты: дизопроксил фумарат или алафенамид (TDF - тенофовир дизопроксил фумарат или TAF - тенофовир алафенамид).

Актуальные схемы комплексной лекарственной терапии (высокоактивная антиретровирусная терапия, ВААРТ) предполагают одновременное использование двух и более препаратов с различными мишенями/механизмами действия, в том числе один или более НИОТ ВИЧ (зидовудин, ламивудин, эмрицитабин, абакавир, тенофовир дизопроксил фумарат или алафенамид). ВААРТ позволяет контролировать репликацию ВИЧ в большей степени, чем индивидуальные препараты, но и для нее нужны новые эффективные и нетоксичные компоненты, поскольку большинство применяемых НИОТ имеют серьезные недостатки. Фармакокинетические свойства и низкая эффективность внутриклеточных превращений (например, только 0.3% AZT преобразуется в клетках в соответствующий трифосфат) обуславливают использование высоких доз препаратов, что, в свою очередь, приводит к росту токсичности. Кроме того, вследствие высокой изменчивости вируса происходит быстрое развитие вирусной резистентности, что также снижает эффективность терапии.

Клинические последствия токсичности AZT включают многочисленные гематологические эффекты, подавление функционирования клеток костного мозга, заболевания печени, миопатии и др. Из-за митохондриальной токсичности AZT больные СПИДом страдают от гиперлактатемии и липодистрофии. Быстрое выведение AZT требует ежедневного трехразового приема препарата. После длительного курса AZT становится неэффективным из-за развития у вируса резистентности к нему. Тем не менее, несмотря на все побочные эффекты, AZT остается довольно широко применяемым препаратом.

Один из способов увеличения эффективности антивирусного препарата состоит в синтезе депо-формы (латентной формы), т.е. такого производного, которое, подвергаясь химическим или ферментативным превращениям в организме, высвобождает активное соединение [24, 25]. Создание депо-форм – это хороший способ снижения токсичности НИОТ за счет, как улучшения фармакокинетических параметров, так и уменьшения сродства к митохондриальным белкам-транспортерам. Такой подход использовали во многих лабораториях мира при поиске новых анти-ВИЧ-агентов, примерами успешного применения депо-форм НИОТ в практической медицине являются тенофовир дизопроксил фумарат или алафенамид и Никавир (Nikavir[®], натриевая соль 5'-Н-фосфоната AZT, фосфазид) [24, 25] (Рис. 8).

Никавир был лицензирован в Российской Федерации в 1999 году как препарат для лечения больных СПИДом и профилактики ВИЧ-инфекции [24, 26, 27]. Никавир получен в результате многолетних исследований по синтезу и изучению противовирусных агентов, проводимых под руководством академика А.А. Краевского в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [24, 27]. Низкая токсичность и хорошая переносимость фосфазид делают его привлекательным компонентом различных вариантов ВААРТ. Он может эффективно использоваться для профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку, в терапии ВИЧ-инфекции, особенно при сопутствующем хроническом вирусном гепатите, а также для предотвращения заражения медперсонала. Фосфазид является первым успешным примером использования 5'-фосфонатного фрагмента для создания депо-формы НИОТ ВИЧ. Данная часть диссертационной работы посвящена синтезу новых депо-форм нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ, а именно 5'-фосфонатных производных AZT, 3ТС и d4T.

2.1. Эфиры 5'-Н-фосфонатов AZT и d4T

2.1.1. Синтез эфиров 5'-Н-фосфонатов AZT и d4T

Первая группа потенциальных депо-форм объединяет неизвестные ранее эфиры 5'-Н-фосфонатов AZT **71-83** и d4T **84-90** (Рис. 8)[28, 29]. Эти незаряженные соединения были

получены для улучшения терапевтических свойств, за счет способности проникать в клетку и постепенно высвобождать активный нуклеозид. Структуры соединений **71-83** и **84-90** были подтверждены УФ-, масс-, ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектрами. В ^1H -ЯМР спектрах присутствовали все сигналы, характерные для нуклеозидного фрагмента и остатка соответствующего спирта, а также дублет с константой около 700 Гц, что типично для производных фосфористой кислоты. ^{31}P -ЯМР спектры содержали два набора сигналов, соответствующие смеси диастереомеров ~1:1. При подавлении фосфор-протонного взаимодействия эти сигналы превращались в два синглета.

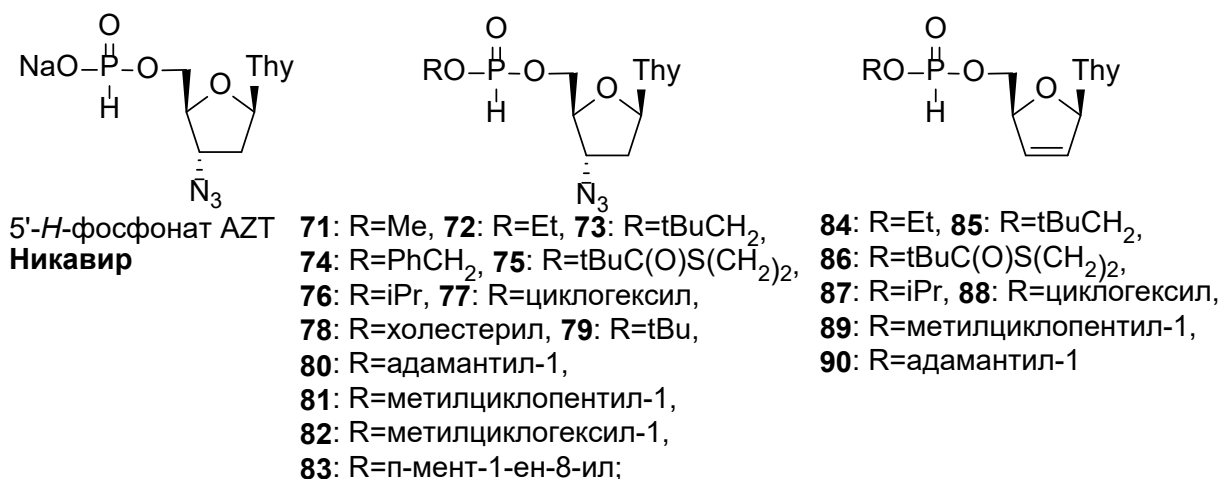


Рисунок 8. Производные *H*-фосфонатов AZT и d₄T.

Стабильность синтезированных соединений **71-83** была изучена в фосфатном буфере при pH 7.5 (см. таблицу 4). Состав смеси и количество продуктов гидролиза анализировали методом ТСХ. Было показано, что продуктом гидролиза эфиров, содержащих остатки первичных и вторичных спиртов (**71-73**, **76-77**) является AZT, а из производных третичных спиртов (**79-80**), образуется 5'-*H*-фосфонат AZT. В результате гидролиза бензильного эфира **74** были получены оба продукта: 70% AZT и 30% 5'-*H*-фосфоната AZT. Время гидролиза половинного количества эфиров **71-83** колеблется от 30 минут (*трет*-бутиловый эфир **79**) до 18 часов (неопентильовый эфир **73**).

Гидролиз в сыворотке крови человека приводил к образованию тех же продуктов, но протекал еще быстрее (см. таблицу 4) [28].

Таким образом, показано, что направление и скорость гидролиза эфиров **71-83** зависят от природы заместителя и от свойств уходящей группы, однако даже для наиболее стабильного соединения **77** время гидролиза половинного количества в сыворотке крови человека составило всего 3 часа. Производные *H*-фосфоната d₄T **84-90** были примерно вдвое устойчивее к химическому и ферментативному гидролизу, чем соответствующие полные эфиры *H*-фосфоната AZT [28, 29].

Таблица 4. Стабильность эфиров *H*-фосфоната AZT

Соединение	Время гидролиза половинного количества соединения		Продукты гидролиза
	pH 7.5	сыворотка крови	
71	1 ч	2 мин	AZT
72	1 ч	15 мин	AZT
73	18 ч	2 ч	AZT
74	1.5 ч	0.5 ч	AZT : <i>H</i> -фосфонат AZT (7:3)
76	7 ч	1 ч	AZT
77	8 ч	3 ч	AZT
79	0.5 ч	5 мин	<i>H</i> -фосфонат AZT
80	1.5 ч	0.5 ч	<i>H</i> -фосфонат AZT
<i>H</i>-фосфонат AZT	240 ч	50 ч	AZT

2.1.2. Анти-ВИЧ активность производных *H*-фосфонатов AZT и d4T

Все синтезированные соединения были переданы на вирусологические испытания в лабораторию проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск) и испытаны на МТ-4 клетках, инфицированных различными штаммами ВИЧ-1 [28, 30, 31]. Активность измеряли после адсорбции вируса по количеству вирусного антигена p24 с использованием иммуноанализа. Цитотоксичность измеряли колориметрическим методом. Все производные AZT продемонстрировали высокую активность, близкую к активности AZT и превышающую таковую для *H*-фосфоната AZT на 1-2 порядка. Ряд эфиров ($R = \text{Me, Et, Me}_3\text{CCH}_2, \text{PhCH}_2, i\text{-Pr, cyclohexyl, cholesteryl, } t\text{-Bu, Ada}$) показали значительную активность в этих клетках, превышающую активность контрольного AZT в 20-30 раз [29]. В то же время токсичность этих соединений была близка к токсичности *H*-фосфоната AZT. Эфиры *H*-фосфонатов d4T **84-90** также имели преимущества как по сравнению с самим d4T, так и по сравнению с его *H*-фосфонатом [29].

Следует отметить, что одинаковые модификации разных нуклеозидов вызывали различный эффект. Так, в серии AZT наиболее активным соединением оказался циклогексиловый эфир **77**, причем его противовирусный эффект превосходил таковой для AZT на два порядка, а для производных d4T наиболее активными были неопентиловый, изопропиловый и адамантиловый эфиры **85, 87 и 90**.

Таким образом, синтезированные нами эфиры обладают хорошими противовирусными свойствами и могут служить депо-формами соответствующих нуклеозидов или *H*-фосфонатов. Однако их химическая стабильность оказалась невысокой, а ферментативная стабильность крайне низкой, что сделало нецелесообразным дальнейшее исследование этой группы соединений.

2.2. Производные фосфоформиатов AZT и d₄T

2.2.1. Синтез производных фосфоформиатов AZT и d₄T

К другому типу фосфорилированных нуклеозидов относится 5'-фосфоформиат **91a** (Рис. 9А), который был синтезирован ранее и представлял собой комбинацию двух антивирусных препаратов в одной молекуле. Фоскарнет (Foscarnet®, натриевая соль фосфономуравьиной кислоты) является мощным ингибитором герпеса, гриппа и ретровирусных полимераз, но его использование ограничено токсичностью и крайне низкой биодоступностью при пероральном приеме. Он одобрен против инфекций вирусов семейства герпеса, включая цитомегаловирус, устойчивый к ацикловиру (особенно у больных СПИДом). Было показано, что комбинация AZT и фосфономуравьиной кислоты (PFA) (1: 200) синергетически ингибирует репликацию ВИЧ-1 и активность ОТ в бесклеточных системах. Кроме того, было продемонстрировано, что мутации, снижающие восприимчивость к PFA, повышают восприимчивость к AZT и подавляют возникновение резистентности к AZT в культурах клеток, обработанных AZT. Однако различие в эффективных антивирусных концентрациях AZT и PFA в клеточных культурах составляет 2-3 порядка. Помимо фосфономуравьиной кислоты и AZT в молекулу был введен большой набор липофильных фрагментов различной длины с целью увеличения проницаемости в клетки и биодоступности. Изучение этих фосфонатов в качестве потенциальных агентов против ВИЧ в различных культурах клеток, инфицированных различными вирусными штаммами (включая резистентные к AZT), не выявило преимуществ по сравнению с исходным AZT и интерес к этим структурам был утрачен.

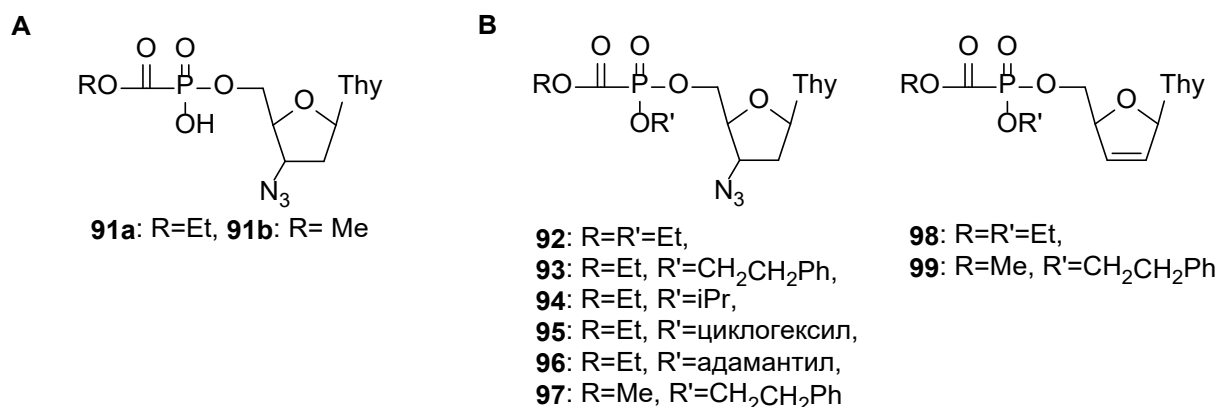
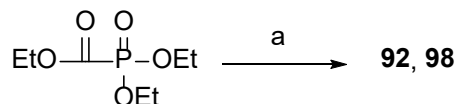


Рисунок 9. Эфиры фосфоформиатов AZT и d₄T

Мы решили модифицировать фосфоформиатные производные AZT, используя ту же стратегию, что и в случае *H*-фосфонатов, т. е. ввести различные заместители по атому фосфора. На первом этапе нами был синтезирован ряд *P*-алкильных эфиров фосфоформиатов AZT **92-97** и d₄T **98-99** (рис. 9В) [32-34].

Синтез эфиров **92** и **98** осуществляли обработкой коммерческого триэтилфосфоформата пятихлористым фосфором или тионилхлоридом и последующим прибавлением нуклеозида (AZT для **92** или d₄T для **98**) к полученному *in situ* хлорангидриду этил(этоксикарбонил)фосфоновой кислоты (Схема 4А). Целевые продукты **92** и **98** были выделены с выходами 73% и 65%, соответственно.

А



В

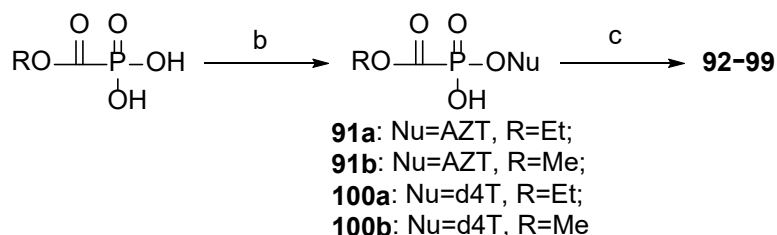


Схема 4. (a) 1) PCl₅ 2) NuH (AZT для **92** или d₄T для **98**); (b) NuH (AZT для **91a,b** или d₄T для **100a,b**), ДЦК; (c) TPSCl, R'OH

Второй способ получения эфиров **92-99** заключался в конденсации фосфоформиатов **91a,b** или **100a,b** с соответствующим спиртом в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPSCl) (Схема 4В). Исходные фосфонаты **91a,b** и **100a,b** синтезировали взаимодействием нуклеозида (AZT для **91a,b** или d₄T для **100a,b**) и алкоксикарбонилфосфоновой кислоты в присутствии ДЦК с выходами ~60%

Неизвестные ранее целевые эфиры фосфонатов **92-99** были выделены колоночной хроматографией на силикагеле с выходами ~30-60% и охарактеризованы УФ-, масс-, ¹H-ЯМР и ³¹P-ЯМР спектрами [32-35]. Благодаря появлению ассиметрии при атоме фосфора, соединения **92-99** являются смесью двух диастереомеров. Так, в ¹H-ЯМР спектрах это наиболее четко проявляется для протонов H-6 и CH₃-Thy, которые представлены двумя наборами сигналов. В ³¹P-ЯМР спектрах, снятых с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, для каждого из этих эфиров наблюдали два синглетных сигнала в соотношении примерно 1:1.

Другой группой синтезированных нами фосфоформиатных производных AZT и d₄T были неизвестные ранее аминокарбонилфосфонаты **101-106** [32]. Амиды **101-106** получали аммонолизом фосфонатов **91a** или **100a** под действием первичных аминов (25% водного аммиака, 25% водного метиламина или фенилэтиламина) и последующей реакцией полученных заряженных амидов **107-112** с этанолом в присутствии TPSCl (Схема 5). При большом избытке амина реакции аммонолиза проходили практически

количественно. В последующей конденсации с этанолом амиды **107-108** и **110-111** после удаления избытка исходного амина в вакууме водоструйного насоса использовали без очистки, а фенилэтиламиды **109** и **112** выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-Toyoparl. Реакция аммонолиза фосфоната **91a** в присутствии вторичных аминов (например, диэтиламина) приводила лишь к следовым количествам продуктов. Все полученные соединения были выделены хроматографией на силикагеле и представляли собой диастереомерные смеси [32-34].

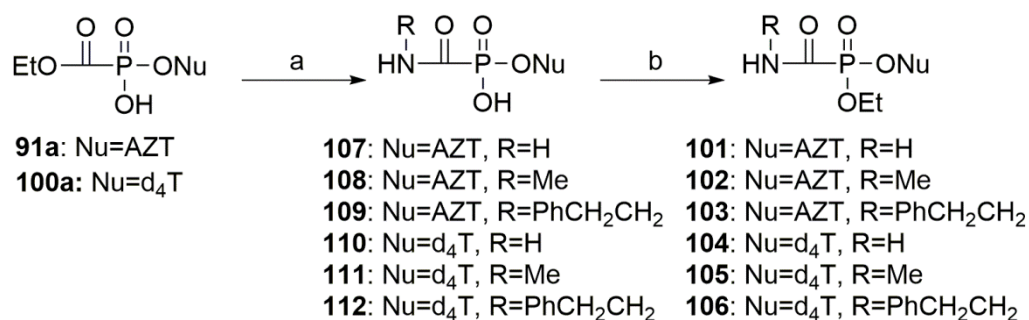


Схема 5. (a) RNH₂; (b) TPSCl, EtOH

Таким образом, синтезированы две группы неизвестных ранее производных фосфоноформиатов AZT и d₄T [32-36].

2.2.2 Анти-ВИЧ активность производных фосфоноформиатов AZT и d₄T

Вирусологические испытания, проведенные в лаборатории проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск), показали, что в МТ-4 клетках, инфицированных различными штаммами ВИЧ-1, в ряду эфиров **92-97** и **98-99** наиболее активны и наименее токсичны (алкил)этоксикарбонилфосфонаты **92**, **93**, **98** и **97**, содержащие при атоме фосфора первичный алкил (этильную или фенэтильную группу) [35, 36]. Благодаря высокой активности (ED₅₀ 2-7 нМ), и низкой токсичности (CD₅₀ 140-200 мкМ), индексы селективности этих соединений значительно (в некоторых случаях на два порядка) превышали таковые для соответствующих нуклеозидов и заряженных производных фосфоноформиатов типа **91**. Токсичность большинства соединений была ниже, чем у контрольных AZT и d₄T, однако производные **94** и **95**, несущие при атоме фосфора вторичные алкилы (изопропил или циклогексил), проявив сходную с наиболее эффективными соединениями активность (ED₅₀ 6-9 нМ), оказались существенно более токсичными (CD₅₀ 2-67 мкМ). Соединение **96**, с третичным остатком адамантила, было нетоксичным, но и по активности существенно проигрывало. Незаряженные 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT **101-103** также показали высокую активность (ED₅₀ 0.2-9 нМ) при низкой токсичности (CD₅₀ 113-250 мкМ). Соответствующие производные d₄T **104-106** были менее активны (ED₅₀ 13-43 нМ) и более токсичны (CD₅₀ 67-214 мкМ),

но даже они выигрывали по индексу селективности (SI 1555-7143) по сравнению с исходным аналогом нуклеозида (ED_{50} 240 нМ, CD_{50} 314 мкМ, SI 1308) [37].

Таким образом, клеточные эксперименты с 5'-этоксикарбонилфосфонатами и 5'-аминокарбонилфосфонатами AZT и d₄T оказались результативными: полные эфиры эффективно подавляли репродукцию ВИЧ-1 в культуре перевиваемых лимфоцитов МТ-4, обеспечивали защиту клеток от цитопатогенного действия вируса и не проявили токсичности в отношении хозяйских клеток [32, 35, 36].

2.2.3. Стабильность производных фосфоноформиатов AZT и d₄T

При гидролизе полные эфиры 5'-этоксикарбонилфосфонатов и 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT и d₄T расщеплялись с образованием целевых нуклеозидных аналогов AZT и d₄T, в качестве основных продуктов, т.е. действительно являлись депо-формами последних [32, 35, 36]. Время химического гидролиза половинного количества полных эфиров фосфоноформиатов в фосфатном буфере (рН 7,2) составило 10 мин для производного AZT **92** и 30 мин для соответствующего эфира d₄T **98**. Замена эфирной группы у атома фосфора с этильного остатка на фенилэтильный (**93**) или изопропильный (**94**) фрагмент приводила к небольшому повышению стабильности ($T_{1/2}$ 40-60 мин). 5'-Аминокарбонилфосфонаты **101-106** проявили большую устойчивость к химическому и ферментативному гидролизу. Зависимость стабильности от рН изучали в фосфатном буфере, в диапазоне рН 5,5-7,8, на примере этилового эфира 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **101**. Время полугидролиза соединения **101** уменьшалось с 16 ч (рН 5,5) до 30 мин (рН 7,8). Введение заместителя по NH_2 -группе повысило стабильность, так в ряду соединений **101-103** время полугидролиза в фосфатном буфере при рН 7,2 составило 2,5 ч для **101**, 6 ч для **102** и более 10 ч для **103**. Однако, даже самые химически стабильные производные фосфоноформиатов оказались неустойчивыми к ферментативному гидролизу в сыворотке крови. Например, время полугидролиза соединения **101** в сыворотке крови при 37°C не превышало 7 мин, а для производного d₄T **104** – 21 мин. Соединения, содержащие d₄T, во всех экспериментах по исследованию химического и ферментативного гидролиза оказались в 2-3 раза стабильней соответствующих аналогов с AZT.

Таким образом, несмотря на хорошую анти-ВИЧ активность, низкая ферментативная стабильность соединений **92-106**, как и в случае с полными эфирами *H*-фосфонатов **71-90**, не позволила продолжать исследования.

2.3. Производные фосфоацетатов AZT и d₄T

Для повышения стабильности потенциальных депо-форм AZT и d₄T были получены эфиры фосфоацетатов **113-116** (Рис. 10) [32, 34].

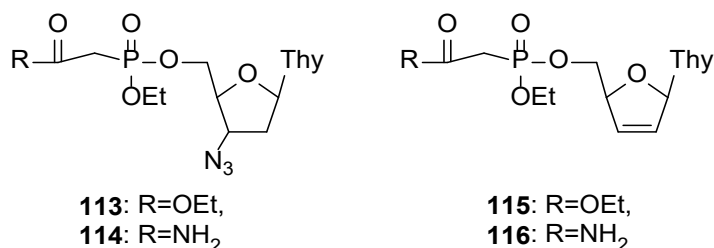


Рисунок 10. Производные фосфоацетатов AZT и d₄T

Синтезировали соединения **113-116** аналогично соответствующим производным фосфоформатов исходя из триэтилфосфоацетата, выделяли и очищали как описано выше. Синтез на примере производных d₄T приведен на схеме 6.

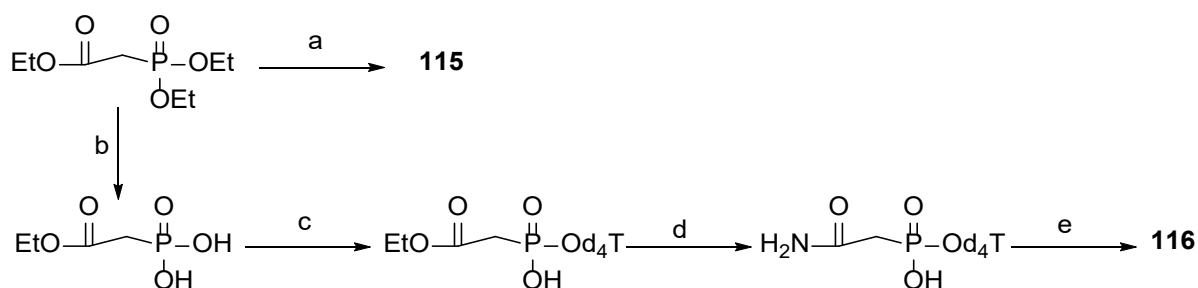
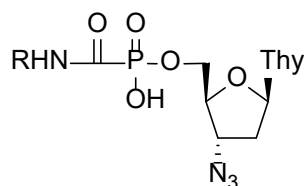


Схема 6. (a) 1) PCl₅ 2) d₄T; (b) Me₃SiBr; (c) d₄T, ДЦК; (d) NH₃/H₂O; (e) TPSCl, EtOH

В отличие от полных эфиров *H*-фосфонатов и фосфоформатов AZT и d₄T, производные фосфоацетатов **113-116** оказались чрезмерно стабильными. Они не гидролизировались не только в фосфатном буфере и сыворотке крови, но и в условиях клеточных экспериментов, в результате чего не проявили заметной противовирусной активности [32, 34].

2.4. 5'-Аминокарбонилфосфонаты AZT

Проанализировав полученные данные по фосфазиду, эфирам *H*-фосфонатов **71-90**, производным других фосфонатов **92-99**, **101-106** и **113-116**, мы пришли к выводу, что анти-ВИЧ свойства, исследованные в культурах клеток, не всегда являются показателями, определяющими перспективность соединений. Не менее важны стабильность и способность поддерживать необходимую концентрацию нуклеозидного аналога в крови. В связи с этим предположением наше внимание привлекли 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT **107-109**, которые служили ключевыми исходными соединениями для синтеза эфиров **101-103**. Были дополнительно получены 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT с этильной, бутильной и гексильной группами по NH-фрагменту (Рис. 11) [37-39].



- 107:** R=H
108: R=CH₃
109: R=PhCH₂CH₂
117: R=C₂H₅
118: R=C₄H₉
119: R=C₆H₁₃

Рисунок 11. Заряженные 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT

Противовирусные эксперименты в клетках МТ-4, инфицированных ВИЧ-1 штамм ГКВ-4046 (НПО Вектор, Кольцово), показали, что 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT ингибировали вирусную репликацию на порядок менее эффективно, чем AZT и примерно в тех же концентрациях, что *H*-фосфонат AZT (Таблица 5). В то же время их токсичность, за исключением производных **108** и **117**, которые на этом основании были исключены из дальнейшего рассмотрения, была значительно ниже, чем у AZT и *H*-фосфоната AZT, что привело к более высоким индексам селективности (Таблица 5) [37-39].

Таблица 5. Анти-ВИЧ свойства фосфонатов **107-109**, **117-119** в культуре клеток, инфицированных ВИЧ-1

Соединение	МТ-4 (ГКВ-4046)		
	CD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI*
107	2700	0.60	4500
108	210	0.20	1050
109	1080	0.20	5400
117	260	0.23	1130
118	1970	0.48	4100
119	1500	0.11	13600
AZT	80	0.037	2200
<i>H</i> -фосфонат AZT	180	0.131	1400

индекс селективности SI = CD₅₀/ED₅₀

Все синтезированные фосфонаты оказались устойчивыми в сыворотке крови человека и цельной крови собаки. Предварительная оценка фармакокинетических

параметров после перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT **107**, **109**, **118** и **119** показала, что все соединения могли метаболизироваться до AZT. Характер кривых зависимости концентрации высвобожденного AZT в плазме крови от времени был сходным у всех изученных амидов. Пиковые концентрации C_{\max} AZT для фосфонатов **107**, **109**, **117** и **118** составляли 3.7, 2.0, 0.8 и 0.9 мг/л соответственно. Таким образом, в пределах этой группы 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107** был самым эффективным донором AZT. Это соединение было изучено более подробно [24, 26, 27, 38-40].

2.4.1. Оптимизация синтеза 5'-аминокарбонилфосфоната AZT

Описанный выше синтез **107** из эфира **91a** проходит с практически количественным выходом. Однако получение **91a** конденсацией этоксикарбонилфосфоновой кислоты и AZT в присутствии ДЦК (Схема 4) ориентировано на небольшие количества вещества и требует трудоемкого выделения продукта колоночной хроматографией. Аналогичные сложности возникали и при использовании других традиционных конденсирующих агентов. В то же время отмеченная эффективность **107** и перспективы проведения дальнейших биологических испытаний требовали разработки упрощенного способа фосфонилирования нуклеозида, реализуемого в типовой промышленной аппаратуре и позволяющего получать 5'-аминокарбонилфосфонат **107** с хорошим выходом и степенью чистоты не менее 96%.

С целью оптимизации способа синтеза **107** были опробованы различные подходы к получению ключевого интермедиата **91a**. Два из них, показавшие лучшие результаты, основаны на фосфонилировании AZT хлорангидридом триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты или дихлорангидридом этоксикарбонилфосфоновой кислоты (Схема 7). В обоих случаях исходным соединением служил триэтилфосфоформат. Первый метод включал в себя обработку триэтилфосфоформата Me_3SiBr , последующие реакции с SOCl_2 и AZT, гидролиз и финальную обработку водным аммиаком. Использование дихлорангидрида этоксикарбонилфосфоновой кислоты сокращает одну стадию и состоит во взаимодействии триэтилфосфоформата с PCl_5 , последующей реакции с AZT и финальный аммонолиз. Преимуществами последнего способа, несмотря на чуть более низкий выход, являются менее дорогие реагенты и упрощение технологии выделения и очистки целевого **107** [41].

Таким образом, удалось разработать простой и технологичный способ синтеза вещества лидера, 5'-аминокарбонилфосфоната **107**, позволяющий получать его в препаративных количествах и чистотой не менее 96% [41].

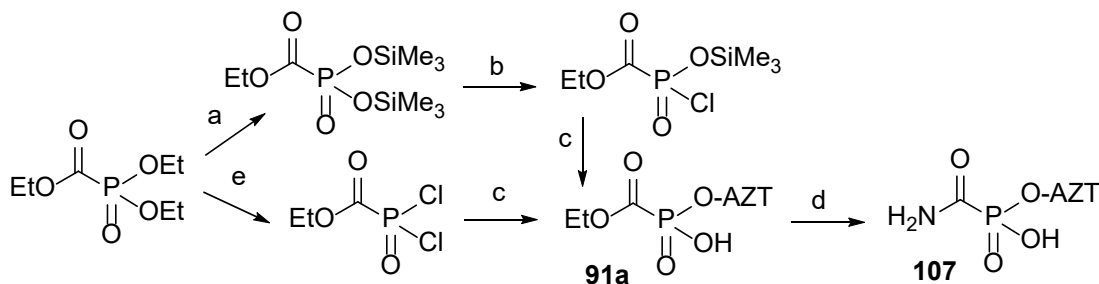


Схема 7. (a) Me_3SiBr , CCl_4 ; (b) SOCl_2 ; (c) 1) AZT, ДМФА; 2) $\text{H}_2\text{O}/\text{Py}$; (d) $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$; (e) PCl_5

2.4.2. Исследование свойств 5'-аминокарбонилфосфоната AZT в клеточных культурах

Изучение противовирусной активности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **107** на культуре лимфобластоидных клеток человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1 штамм ГKB-4046 (НПО Вектор, Кольцово) показало, что его противовирусная активность примерно на порядок уступает активности AZT и в 3–4.5 раз ниже, чем у фосфазида. Однако его токсичность снижалась в еще большей степени (в 34–50 и 12.5–15 раз соответственно), благодаря чему фосфонат **107** обладал более высоким химиотерапевтическим индексом, чем AZT и фосфазид [38, 39, 42].

Эффективность проникновения в клетки фосфоната **107** была в 10–100 раз ниже, чем AZT, и приблизительно в 6 раз ниже, чем у фосфазида [38]. Это позволяет предположить, что понижение анти-ВИЧ активности и токсичности в культуре клеток МТ-4 по сравнению с показателями для AZT и фосфазида отражает уменьшение эффективности проникновения в клетки, т.е. существует прямая зависимость между проникновением фосфоната **107**, фосфазида и AZT в культивируемые клетки и противовирусными свойствами этих соединений. Необходимо отметить, что обе депо-формы достаточно стабильны при испытании в культуре клеток, в то время как в организме они эффективно превращаются в AZT [38].

2.4.3. Исследование стабильности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT

Стабильность фосфоната **107** в 100% сыворотке крови человека оказалась сопоставимой со стабильностью фосфазида: время полужизни обоих соединений превышает 6 ч [38]. В то же время в цельной крови собаки при 37°C фосфонат **107** был существенно более устойчивым, чем фосфазид ($T_{1/2} > 24$ ч против 3 ч).

2.4.4. Исследование фармакокинетических параметров 5'-аминокарбонилфосфоната AZT при однократном введении¹

Беспородные собаки (средний вес 22 ± 3.4 кг)

В результате фармакокинетического изучения препарата **107** (капсулы № 2; 250, 500 и 1000 мг или 10, 20 и 40 мг/кг) установлено, что большая его часть метаболизируется до фармакологически активного AZT. Фармакокинетические параметры высвобожденного AZT после однократного перорального приема собаками фосфоната **107** приведены в таблице 6 [24, 26, 27, 38].

Таблица 6. Фармакокинетические параметры 5'-аминокарбонилфосфоната **107** и его основного метаболита AZT после однократного перорального приема собаками капсул 5'-аминокарбонилфосфоната **107** в дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы тела

Доза 107 , мг	Тестируемое вещество	Фармакокинетические параметры					
		C_{\max} , мг/л	t_{\max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	C_{\max}/AUC , 1/ч
10	107	0.31 ± 0.09	1.5 ± 0.25	0.47 ± 0.15	0.62 ± 0.1	2.43 ± 0.04	0.662 ± 0.066
	AZT	0.36 ± 0.24	4.7 ± 1.0	2.87 ± 1.56	4.57 ± 1.5	8.90 ± 5.34	0.119 ± 0.033
20	107	0.51 ± 0.18	1.6 ± 0.2	0.98 ± 0.44	0.81 ± 0.2	2.65 ± 0.16	0.561 ± 0.122
	AZT	0.69 ± 0.49	5.0 ± 1.7	6.0 ± 3.3	9.7 ± 4.3	12.0 ± 2.6	0.107 ± 0.023
40	107	0.51 ± 0.26	1.75 ± 0.27	1.25 ± 0.86	0.59 ± 0.2	2.87 ± 0.49	0.478 ± 0.117
	AZT	0.98 ± 0.56	6.0 ± 1.3	10.4 ± 6.1	7.0 ± 2.5	12.2 ± 1.4	0.100 ± 0.016

AUC_t – площадь под кривой «концентрация–время»; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; t_{\max} – время достижения максимальной концентрации; C_{\max} – максимальная концентрация субстанции; $t_{1/2}$ – период полувыведения.

Сравнение фосфоната **107** с AZT и фосфазидом (Таблица 7) показало, что пиковая концентрация AZT при приеме фосфоната **107** в плазме была ниже, тогда как накопление AZT и время выведения были более длительными. Фармакокинетические параметры AZT, образующегося из фосфоната **107**, были близки к параметрам фосфазиды (C_{\max} в 2.5 раза меньше, AUC в 2 раза меньше, но t_{\max} и другие параметры больше). Максимальная концентрация AZT после перорального приема фосфоната **107** достигалась через 4 ч, что в 2 раза больше, чем при приеме AZT, и на 1 ч больше, чем у фосфазиды (Таблица 7). Заслуживает внимания, что значения $t_{1/2}$ и t_{\max} для AZT у собак увеличивались в следующем порядке: AZT < фосфазид < 5'-аминокарбонилфосфонат AZT, что позволяет

¹ Исследования проведено в сотрудничестве с АО «Ассоциация AZT»

рассматривать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107** как депо-форму AZT пролонгированного действия.

Таблица 7. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **107**, фосфазида или AZT в дозах, эквивалентных 20 мг AZT/кг массы тела

Соединение	C_{\max} , мг/л	t_{\max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	CL, л/ч
107	0.74 ± 0.03	5	9.2 ± 0.2	9.6 ± 0.2	13.9 ± 0.2	27 ± 2.6
фосфазид	1.89 ± 0.07	4	16.6 ± 0.3	7.2 ± 0.3	10.4 ± 0.5	15 ± 0.7
AZT	9.77 ± 0.3	2.5	58.8 ± 1.1	5.2 ± 0.5	7.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3

AUC_t – площадь под кривой «концентрация–время»; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; t_{\max} – время достижения максимальной концентрации; C_{\max} – максимальная концентрация субстанции; $t_{1/2}$ – период полувыведения. CL – клиренс

В плазме крови собак после внутривенного введения субстанции фосфоната **107** в дозе 50 мг (2–5 мг/кг веса тела) AZT не был зафиксирован. Фармакокинетические параметры исходного **107** составляли: $AUC_t = 2.19$ мг·ч/л, $t_{1/2} = 0.35$ ч, MRT = 0.74 ч, CL = 16.8 л/ч, $V_{ss} = 12.4$ л.

Биодоступность 5'-аминокарбонилфосфоната **107** после перорального приема в использованных дозах составляла 4.7%, а биодоступность AZT после перорального приема **107** – 8%, что в 2 раза меньше, чем у фосфазида. Биодоступность AZT при пероральном приеме самого AZT была в 6 раз выше, чем в случае фосфоната **107**. Однако высокое значение AUC при приеме AZT связано с избыточной пиковой концентрацией в плазме, которая очень быстро понижается. Это вызывает токсичность и быстрое появление штаммов вируса, устойчивых к воздействию препарата. Напротив, при приеме фосфоната **107** перепад между максимальной и минимальной концентрацией AZT в крови существенно менее выражен, что может способствовать снижению токсичности и замедлению возникновения резистентности [24, 26, 27, 38].

Кролики породы шиншилла (средний вес 3 ± 0.4 кг)

Изучение фармакокинетики фосфоната **107**, водный раствор которого вводили в желудок кроликов, также подтвердило, что он является депо-формой AZT. AZT не найден в периферической крови кроликов (как и собак), которым фосфонат **107** вводили внутривенно, – единственным обнаруженным продуктом был исходный фосфонат **107** [24]. Это подтверждает гипотезу о том, что AZT образуется во время абсорбции исходного соединения [24, 38].

Сравнение фармакокинетических параметров AZT и фосфоната **107** после однократного перорального приема кроликами фосфоната **107** в дозах 7, 70 и 200 мг/кг веса показало, что AZT присутствовал в крови во всех случаях. При этом характер кривых «концентрация–время» и соотношения AZT и исходного **107** практически не менялись при изменении дозы [38]. Результаты сравнения фармакокинетических свойств AZT после перорального приема кроликами однократной дозы AZT, фосфазида или фосфоната **107** приведены в таблице 8.

Таблица 8. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема кроликами 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **107**, фосфазида или AZT в дозах, эквивалентных 200 мг AZT/кг массы тела

Соед.	C_{\max} , мг/л	t_{\max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	CL/F, л/ч
107	3.75 ± 0.01	3.5	25.12 ± 1.08	3.66 ± 0.74	4.72 ± 0.08	44.22 ± 1.95
фосфазид	7.38 ± 3.08	2.0	22.99 ± 10.17	1.42 ± 0.12	3.02 ± 0.12	54.95 ± 22.85
AZT	39.64 ± 4.24	1.0	88.5 ± 25.5	2.13 ± 0.71	2.10 ± 0.30	9.40 ± 2.70

AUC_t – площадь под кривой «концентрация–время»; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; t_{\max} – время достижения максимальной концентрации; C_{\max} – максимальная концентрация субстанции; $t_{1/2}$ – период полувыведения

Следует отметить, что форма кривой зависимости концентрации AZT, высвобожденного из фосфоната **107**, была существенно более гладкой, величины C_{\max} AZT, высвобожденного из фосфазида или фосфоната **107**, отличались только в 2 раза, а величины AUC обоих фосфонатов были довольно близкими [38].

Крысы линии Вистар и мыши линии BALB/c

При пероральном введении крысам (масса тела 200 ± 7 г) фосфоната **107** в дозе 20 мг/кг исходный фосфонат **107** в плазме крови не определялся. Доступным для определения был только его метаболит – AZT, имеющий следующие фармакокинетические параметры: $AUC_{0-t} = 2.27$ мг·ч/л, MRT = 6.54 ч, $t_{\max} = 4$ ч, $C_{\max} = 0.4$ мг/л, $t_{1/2} = 2.45$ ч и $C_{\max}/AUC_t = 0.176$ ч⁻¹ [27].

При внутрибрюшинном введении крысам (масса тела 250 ± 10 г) фосфоната **107** в дозе 20 мг/кг, наоборот, в плазме определялся главным образом сам фосфонат **107** и следовые количества его метаболита AZT [27]. Фармакокинетические параметры фосфоната **107** составляли: $AUC_{0-t} = 8.02$ мг·ч/л, MRT = 0.82 ч, CL = 0.45 л/ч, $t_{1/2} = 0.42$ ч и $V_{ss} = 0.37$ л. Заслуживает внимания тот факт, что после внутрибрюшинного введения мышам фосфоната **107** в дозе 6 г/кг веса в крови выявлен не только исходный фосфонат **107**, но и 3.5% AZT.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107** высвобождает AZT после введения различными способами (перорально, внутрижелудочно или внутривенно) экспериментальным животным (мыши, крысы, кролики и собаки) в широком диапазоне доз (7–6000 мг/кг веса) [24]. Фармакокинетические параметры фосфоната **107** и высвобождаемого из него AZT различаются в плазме крови разных видов животных. Эти различия могут быть связаны с особенностями метаболизма у различных животных и/или со способами введения препарата.

2.4.5. Исследование фармакокинетических параметров при многократном введении 5'-аминокарбонилфосфоната AZT

Результаты многократного приема 5'-аминокарбонилфосфоната AZT также выглядят многообещающими [27].

Эксперименты на кроликах показали, что после курсового перорального введения (раствор – 1 г в 4–5 мл воды, прием через 6 и 18 ч в течение 5 дней) фосфонат **107** постепенно накапливается в крови. Кроме того, после последней дозы (96 ч после начала эксперимента) AZT детектировался в крови через 66 ч (162 ч от начала эксперимента).

Собакам (средний вес 10.2 ± 1 кг) препарат **107** вводили перорально (600 мг натошак в течение 7 дней с интервалом 24 ч). AZT определялся в плазме на протяжении всего интервала между приемами фосфоната **107**. Одинаковые значения C_0 (0.17 ± 0.07 мг/л) и C_{\min} (0.17 ± 0.07 мг/л) на 7-й день курсового введения препарата говорят о достижении равновесного состояния. Значение квазистационарной концентрации составило 0.96 мг/л. Флуктуация уровней AZT в плазме в равновесной стадии (2.82 ± 0.26) была вполне приемлемой.

На 7-й день курсового перорального введения капсул фосфоната **107** отмечалось накопление AZT в организме собак, что выражалось в увеличении значений AUC (в 1.3 раза по сравнению с первым днем приема) и C_{\min} (в 1.7 раза по сравнению с первым днем), а также в удлинении t_{\max} (с 2.7 до 4 ч) и возрастании C_{\max} (с 2.45 до 2.75 мг/л плазмы крови).

Таким образом, доказано, что 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107** значительно менее токсичен, чем утвержденные лекарственные препараты ретровир и никавир, не обладает мутагенными и аллергизирующими свойствами, а также иммунотоксичностью, эмбриотоксичностью и тератогенностью, не влияет на репродуктивную функцию животных.

Клиническое изучение фосфоната **107** при однократном введении добровольцам и курсовом приеме (в течение 35-и дней) ВИЧ-инфицированными пациентами показало

хорошую безопасность и переносимость препарата. При этом фармакокинетические исследования показали, что при приеме внутрь **107** практически полностью метаболизируется до AZT и подтвердили данные доклинических исследований о пролонгированном действии **107**. На рисунке 12 представлено сравнение фармакокинетических кривых AZT в плазме крови после перорального приема добровольцами зидовудина (3 раза по 200 мг), фосфазида (два раза 400 мг) и фосфоната **107** (1000 мг однократно).

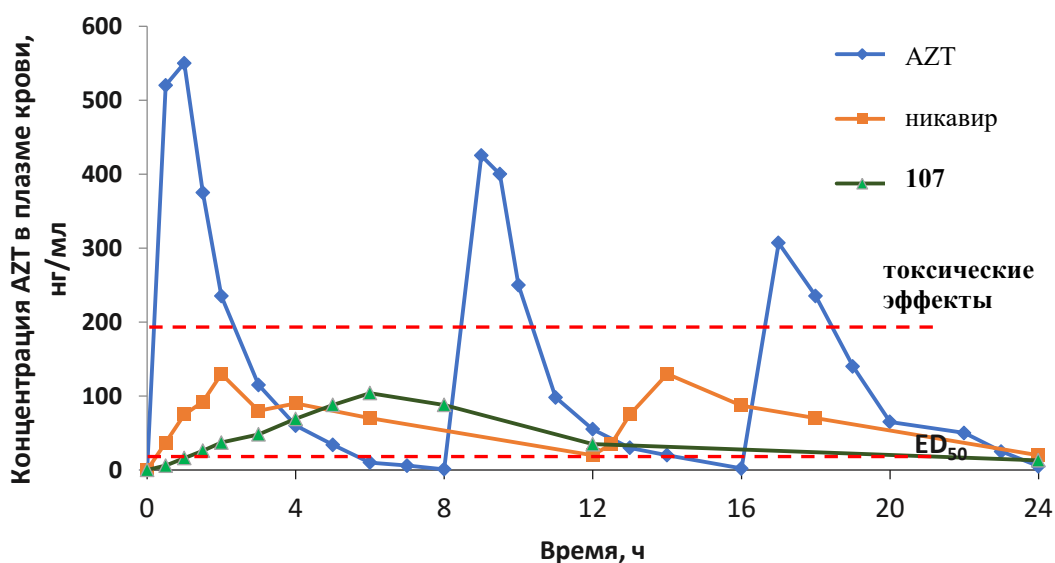


Рисунок 12. Концентрация AZT в плазме крови после перорального приема добровольцами зидовудина (3 раза по 200 мг), фосфазида (два раза 400 мг), фосфоната **107** (1000 мг однократно)

Выводы по разделу 2.2.

Синтезирована 51 новая потенциальная депо-форма НИОТ ВИЧ-1, основанная на 5'-фосфонатной модификации AZT или d₄T. Проведена оценка их стабильности, антивирусной активности и цитотоксичности. По совокупности полученных данных в качестве соединения лидера был выбран 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107**. Доклинические испытания 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **107** дали обнадеживающие результаты. Фармакокинетические исследования, проведенные на животных, показали, что при приеме внутрь фосфонат **107** в значительной степени превращается в AZT, причем фармакокинетические параметры AZT указывают на пролонгацию его фармакологического действия.

Анализ доклинических токсикологических и фармакологических данных позволил рекомендовать фосфонат **107** для клинических исследований. Фармакокинетические

свойства этого соединения позволяют использовать созданный на его основе препарат раз в сутки, в отличие от зидовудина, который применяется 2–3 раза в сут. Из-за меньшей токсичности фосфонат **107** может применяться не только для профилактики вертикальной передачи ВИЧ, но также для детей и ВИЧ-инфицированных пациентов с больной печенью.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107** имеет превосходный потенциал как альтернатива AZT и Никавиру, заслуживает дальнейшего исследования и в настоящий момент проходит 3 стадию клинических испытаний.

3. Депо-формы НИОТ ВИЧ, способные высвобождать два активных компонента

Стратегия создания депо-форм – это хорошо известный и эффективный способ преодоления таких недостатков активного соединения, как плохая растворимость, низкая биодоступность и др. Использование депо-форм может улучшить фармакокинетический профиль и сделать доставку лекарства к цели более эффективной. Обычно депо-форма состоит из активной части, которая в результате превращений *in vivo* станет лекарством, и вспомогательной неактивной части, которая помогает достичь цели действия, а затем гидролизует химическим или ферментативным путем в одну или несколько стадий. Идея создания депо-форм двойного действия заключалась в том, чтобы избавиться от неактивной части и объединить в одной молекуле два противовирусных агента разной природы.

3.1. *O*-(L-2',3'-Дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-O'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат - гетеродимер, содержащий два нуклеозидных ингибитора ОТ ВИЧ.

O-(L-2',3'-Дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-O'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат **120** [43] (Рис. 13) является депо-формой двух анти-ВИЧ препаратов: AZT (зидовудин или ретровир) и ЗТС (ламивудин), применяемых в высоко активной антиретровирусной терапии совместно, в виде коктейля «Комбивир». Получение гетеродимера **120** проводили взаимодействием 5'-аминокарбонилфосфоната ЗТС с AZT в присутствии конденсирующего агента TPSCl в пиридине в течение 72 часов. Получено 2 г целевого гетеродимера **120**. Целевой продукт **120** был охарактеризован методами ¹H, ³¹P-ЯМР спектроскопии. Общий выход на этоксикарбонилфосфоновую кислоту составил 32%, выход на последней стадии - 55% [43].

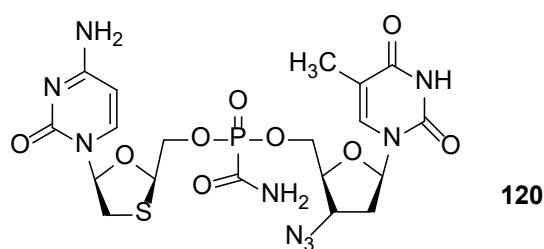


Рисунок 13. Структура гетеродимера **120**, содержащего два нуклеозидных ингибитора ОТ ВИЧ

Гидролиз гетеродимера приводит к смеси четырех продуктов: 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **107**, 3TC, AZT, 5'-аминокарбонилфосфонат 3TC **121** (Рис. 14). Ранее нами было показано, что 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT (**107**) и 3TC (**121**) являются эффективными депо-формами пролонгированного действия соответствующих НИОТ ВИЧ [24, 38, 44-46]. Таким образом, независимо от пути гидролиза, целевой гетеродимер **120** будет давать оба необходимых антивирусных агента.

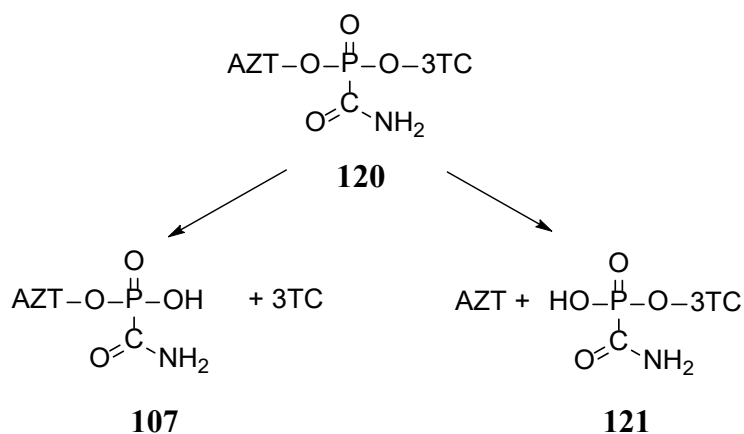


Рисунок 14. Структуры продуктов гидролиза гетеродимера **120**.

Данный гетеродимер мало стабилен при щелочных и нейтральных значениях pH, однако при переходе в слабо-кислую и кислую среды стабильность значительно возрастает (Таблица 9).

Таблица 9. Химическая стабильность гетеродимера **120**.

pH	T _{1/2} , ч
	гетеродимер
3.3	>24
5.15	≈12
6.2	1
8.6	<<0.08

Изучение токсичности и антивирусной активности целевого гетеродимера **120** проводили в институте вирусологии им. Ивановского. Соединение подавляет репродукцию вируса иммунодефицита человека в культуре клеток МТ-4, обеспечивает

защиту клеток от цитопатогенного действия вируса и не проявляет токсичности в отношении хозяйских клеток вплоть до крайне высоких концентраций (Таблица 10) [43].

Анти-ВИЧ активность гетеродимера **120** дополнительно исследовали в лимфоидной ткани человека *ex vivo*, экспериментальной системе, разработанной в лаборатории Л.Б Марголиса (Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, USA) [43]. Эта система достоверно отражает важные аспекты лимфоидной ткани *in vivo*, где происходят критические события патогенеза ВИЧ у ВИЧ-инфицированных. Лимфоидная ткань человека поддерживает продуктивную ВИЧ-инфекцию без экзогенной активации и стимуляции, сохраняет цитоархитектуру ткани и пути экспрессии ключевых поверхностных молекул клетки, связанных с ВИЧ-инфекцией. Кроме того, такая система отражает изменчивость *in vivo* от донора к донору и позволяет тестировать потенциальные лекарства в качестве предварительного шага перед участием в дорогостоящих и длительных клинических испытаниях. Обнаружено, что гетеродимер **120** эффективно подавляет репликацию ВИЧ-1 в культуре тканей миндалин с EC_{50} 11 нМ, ниже, чем у 3ТС или никавира, но выше, чем у AZT [43].

Таблица 10. Токсичность и анти-ВИЧ активность целевого гетеродимера **120**

Соединение	ED ₅₀ , мкМ	TD ₅₀ , мкМ	SI
Гетеродимер 120	0.0035	> 500	>142800
никавир	0.131	0.184	1405
AZT	0.0018	17.3	9611

ED₅₀ - это эффективная доза, концентрация вещества при которой происходит подавление вируса на 50%; TD₅₀- это токсическая доза, концентрация вещества при которой погибает 50% клеток; SI – индекс селективности, отношение TD₅₀ к ED₅₀

Для оценки токсичности гетеродимера, наши коллеги сравнили количество живых клеток в тканях, обработанных гетеродимером **120**, и в необработанном контроле от того же донора [43]. Значительной потери клеток в общем количестве лимфоцитов или в субпопуляциях лимфоцитов CD4⁺ или CD8⁺ не обнаружено. Дополнительно исследовали, может ли соединение быть токсичным для некоторых специфических субпопуляций Т-клеток, необходимых для заражения ВИЧ-1, в частности, для наивных, TCM, TEM и TEMRA CD4⁺ Т-клеток и для CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих любой из трех следующих маркеров активации: CD25, CD38 и HLA-DR. Соединение не вызывало значительной потери какой-либо из изученных субпопуляций в человеческих тканях *ex vivo*.

Исследование метаболизма гетеродимера **120** в тканях показало, что он расщепляется на AZT, аминокарбонилфосфонат AZT **107**, ЗТС и аминокарбонил фосфонат ЗТС **121**. Первая стадия гидролиза является быстрой, спонтанной и не опосредуется какими-либо ферментами. После 18-часовой инкубации по данным ВЭЖХ анализа производные фосфонатов **107** и **121** находятся в значительном избытке в плазме крови по сравнению с ЗТС и AZT [43]. В дальнейшем фосфонатные производные **107** и **121** медленно превращаются в AZT и ЗТС.

Таким образом, преимущество использования гетеродимера ЗТС-AZT **120** заключается не в том, что он значительно более активен, чем исходные НИОТ ВИЧ, а в том, что высвобождает первую часть ЗТС и AZT быстро, в то время как два других продукта гидролиза гетеродимера, фосфонаты **107** и **121**, затем расщепляются до ЗТС и AZT медленно, сглаживая фармакокинетический профиль, продлевая присутствие НИОТ и создавая таким образом эффект депо [43].

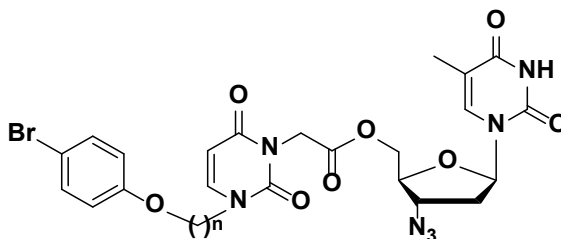
3.2. Комбинированные антивирусные агенты против ВИЧ и HCMV

С момента обнаружения СПИДа, вызываемого ВИЧ, сопутствующие инфекции стали серьезной клинической проблемой. Цитомегаловирус человека (HCMV) является одной из наиболее распространенных оппортунистических инфекций, наблюдаемых у ВИЧ-инфицированных пациентов. Носителями HCMV могут быть люди всех возрастов. HCMV не является сильным патогеном для иммунокомпетентных людей, однако у ВИЧ-инфицированных он вызывает широкий спектр серьезных заболеваний, таких как ретинит, пневмония, колит и др., а также ускоренное развитие ВИЧ-инфекции и увеличение числа случаев появления СПИДа, кроме того увеличивается риск передачи ВИЧ. Даже сегодня, в эпоху существования высокоактивной антиретровирусной терапии, обнаружение HCMV в крови пациентов с ВИЧ является поводом для плохого прогноза. Появление комбинированных противовирусных препаратов, способных подавлять оба вируса, ВИЧ и HCMV, может быть полезным как для пациентов, уже инфицированных ВИЧ, так и для профилактики передачи ВИЧ. Разработка лекарств двойного действия, сочетающих активность против ВИЧ и HCMV, представляет собой новую терапевтическую стратегию. Такие агенты могут иметь существенные преимущества по сравнению с комбинацией родительских препаратов.

3.2.1. Синтез гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV

Соединения **122a-f** (Рис. 15) представляют собой конъюгаты 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина, классического нуклеозидного ингибитора биосинтеза ДНК,

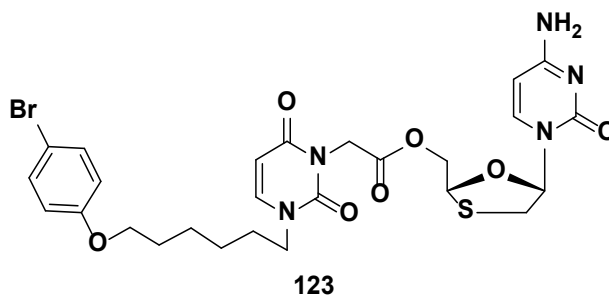
катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ, и ненуклеозидных ингибиторов репликации HCMV [47]. В качестве ненуклеозидных ингибиторов репликации HCMV были выбраны 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производные урацила, ранее продемонстрировавшие существенную активность [48].



122a: n=3; **122b:** n=5; **122c:** n=6; **122d:** n=8; **122e:** n=10; **122f:** n=12

Рисунок 15. Структуры гетеродимеров **122**

Для получения целевых гетеродимеров **122a-f** 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]урацилы были превращены в соответствующие [2,6-диоксо-3-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]уксусные кислоты, которые затем в присутствии дициклогексилкарбодиимида подвергали конденсации с AZT в пиридине. Выходы 5'-[2,6-диоксо-3-(ω-феноксиалкил)-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]ацетатов 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина **122a-f** после выделения и очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле составили 52-74% [47].



123

Рисунок 16. Структура гетеродимера **123**

Сходным образом был получен гетеродимер **123** (Рис. 16), содержащий в качестве НИОТ ВИЧ ЗТС и 1-[6-(4-бромфенокси)гексил]урацил, соединенные остатком уксусной кислоты. Выход составил 19,5%. Структуры и высокую степень чистоты соединений **122a-f** и **123** подтверждали современными физико-химическими методами (^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, тонкослойная хроматография в различных системах).

3.2.2. Исследование стабильности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV

Соединения **122a-f** продемонстрировали высокую химическую стабильность и способность высвобождать активные противовирусные компоненты под действием эстераз (Рис. 17). В процессе гидролиза в присутствии эстеразы из печени свиньи (буфер трис-HCl 50 mM pH 8.2, NaCl 250 mM, CaCl₂ 6 mM, эстераза 9.2 ед./пробу, 6 мкл 16 mM раствора субстрата в метаноле, общий объем смеси 30 мкл, 37°C) появлялись два основных продукта, идентифицированные методами ТСХ и масс-спектрометрии высокого разрешения как 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин и соответствующая [2,6-диоксо-3-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]уксусная кислота. За 15 часов инкубации гидролиз проходил на 30-50%. Для контроля работы фермента использовали диацетат тимидина, гидролиз которого полностью проходит за 6 часов в тех же условиях.

Гидролиз гетеродимера **123** протекал более медленно, но с образованием аналогичных продуктов: 3ТС и соответствующая [2,6-диоксо-3-[6-(4-бромфенокси)гексил]-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]уксусная кислота.

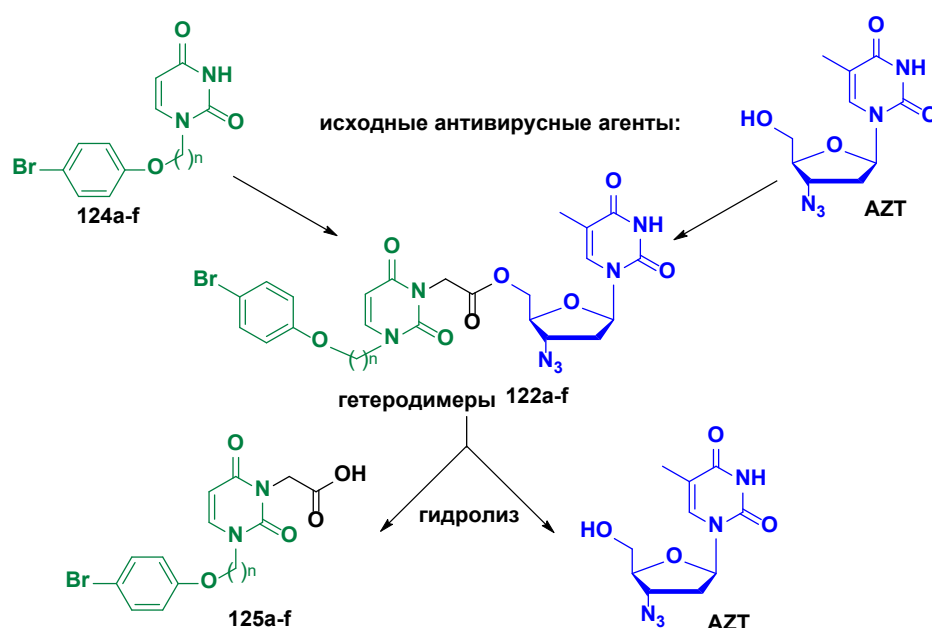


Рисунок 17. Продукты гидролиза гетеродимеров **122a-f** под действием эстераз

3.2.3. Исследование биологической активности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV

Предварительную оценку активности конъюгатов **122a-f** против HCMV проводили в лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека. Оценку цитотоксичности и противовирусной активности гетеродимера **122c** в системе тканей

человека *ex vivo* на фрагментах ткани миндалин, культивированных в соответствии с разработанной ранее методикой [43], проводили в лаборатории Л.Б Марголиса (Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Для оценки эффективности подавления обеих инфекций образцы ткани миндалин были одновременно инфицированы ВИЧ-1 (X4LAI.04) и HCMV (AD169). Полученные образцы обрабатывали соединением **122c** в концентрации 10 мкМ. Показано полное ингибирование репликации ВИЧ-1 и HCMV (Рис. 18). Для гетеродимера **123**, содержащего ЗТС и 1-[6-(4-бромфенокс)гексил]урацил, были получены сходные результаты.

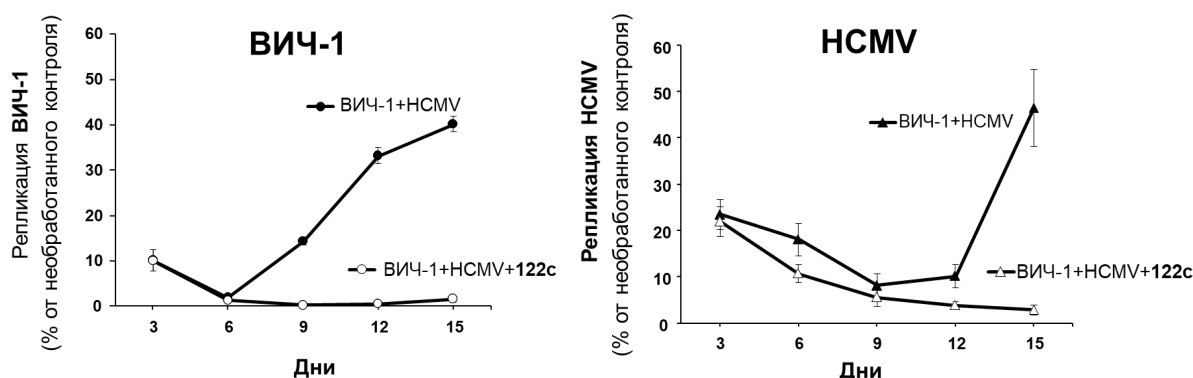


Рисунок 18. Ингибирование репликации ВИЧ-1 и HCMV гетеродимером **122c** в тканях миндалин при двойном инфицировании.

Таким образом, для целевых конъюгатов **122** и **123**, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV, показаны:

- способность высвобождать активные антивирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз);
- противовирусная активность в отношении HCMV. ИД₅₀ составило 2-9 мкМ в микробицидной и 3-12 мкМ в терапевтической схемах воздействия соединений;
- отсутствие существенной цитотоксичности для диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека (CC₅₀ 170- 600 мкМ);
- анти-ВИЧ активность на культуре клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1 (EC₅₀ 0.19-0.83 мкМ);
- отсутствие существенной цитотоксичности для клеток МТ-4 (CC₅₀ >100 мкМ);
- отсутствие цитотоксичности в системе тканей человека *ex vivo* для соединений-лидеров в концентрации 10 мкМ.
- способность соединений-лидеров в концентрации 10 мкМ полностью подавлять репликацию ВИЧ в системе тканей человека *ex vivo*;

- способность соединений-лидеров в концентрации 10 μM полностью подавлять репликацию ВИЧ и HCMV в системе тканей человека *ex vivo* при одновременном инфицировании ВИЧ-1 (LAI.04) и HCMV [47].

ВЫВОДЫ

1. Новые 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов охарактеризованы в качестве агентов, активных в отношении социально-значимых инфекций вирусной и бактериальной природы, в том числе с лекарственной устойчивостью. Проведен анализ зависимости биологической активности от структуры синтезированных веществ; выявлены соединения, являющиеся наиболее перспективными для последующих модификаций с целью увеличения активности и понижения токсичности.
2. На основе карбоциклических аналогов аденозина и гуанозина осуществлен синтез неизвестных ранее динуклеозидолигофосфонатов, представляющих собой новый тип ингибиторов биосинтеза провирусной ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ.
3. Разработаны методы синтеза группы производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, несущих модификации по 3-, 5-, 6- и/или 4'-положениям молекулы. Впервые показана способность этих соединений выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1 дикого типа, а также ее мутантной формы, соответствующей штамму ВИЧ-1, резистентному к ННИОТ первого поколения.
4. Показана способность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов эффективно ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе штамма с множественной лекарственной устойчивостью, а также рост ряда других бактерий и микроорганизмов. Процесс ингибирования роста клеток *M. tuberculosis* H37Rv сопровождается накоплением липидных внутриклеточных вакуольподобных включений в клетках, частичным и / или полным разрушением трехслойной оболочки клетки.
5. Синтезирована 51 новая потенциальная депо-форма НИОТ ВИЧ-1, основанная на 5'-фосфонатной модификации AZT или d4T. Проведена оценка их стабильности, антивирусной активности и цитотоксичности.
6. На основании полученных данных в качестве соединения-лидера был выбран 5'-аминокарбонилфосфонат AZT. Проведены его доклинические испытания, продемонстрировавшие пролонгацию его фармакологического действия по сравнению с AZT и меньшую токсичность. В настоящий момент 5'-аминокарбонилфосфонат AZT проходит 3 стадию клинических испытаний.

7. Осуществлен дизайн и синтез депо-форм нового типа, высвобождающих в клетке два активных компонента и представляющих собой гетеродимеры двух НИОТ ВИЧ-1 или гетеродимеры НИОТ ВИЧ-1 с ННИ HCMV. Синтезировано 8 гетеродимеров, обладающих активностью в отношении ВИЧ и сопутствующих герпесвирусов. Испытания, проведенные в культурах клеток и в инфицированных тканях, подтвердили способность высвобождать активные антивирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз); показано отсутствие цитотоксичности и наличие противовирусной активности в отношении ВИЧ и HCMV.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Матюгина Е. С., Хандажинская А. Л., Кочетков С. Н. Карбоциклические аналоги нуклеозидов: классификация, ферменты-мишени и механизмы действия, синтез // Успехи химии. – 2012. – Т. 81, № 8. – С. 729-746.
2. Матюгина Е. С., Хандажинская А. Л. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. – Т. 63, № 5. – С. 1069-1080.
3. Khandazhinskaya A. L., Shirokova E. A., Skoblov Y. S., Victorova L. S., Goryunova L. Y., Beabealashvilli R. S., Pronyaeva T. R., Fedyuk N. V., Zolin V. V., Pokrovsky A. G., Kukhanova M. K. Carbocyclic dinucleoside polyphosphonates: Interaction with HIV reverse transcriptase and antiviral activity // Journal of Medicinal Chemistry. – 2002. – Т. 45, № 6. – С. 1284-1291.
4. Shirokova E. A., Khandazhinskaya A. L., Skoblov Y. S., Goryunova L. Y., Beabealashvilli R. S., Krayevsky A. A. Modified dinucleoside tetraphosphonates, new potential inhibitors of HIV reverse transcriptase // Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids. – 2001. – Т. 20, № 4-7. – С. 1033-1036.
5. Yegorov Y. E., Kazimirschuk E. V., Terekhov S. M., Karachentsev D. N., Shirokova E. A., Khandazhinskaya A. L., Meshcheryakova J. A., Corey D. R., Zelenin A. V. Telomerase-dependent reactivation of DNA synthesis in macrophages implies alteration of telomeres // Cell Biology International. – 2002. – Т. 26, № 12. – С. 1019-1027.
6. Khandazhinskaya A., Matyugina E., Novikov M. Uracil derivatives as non-nucleoside inhibitors of viral infections // Annual Reports in Medicinal Chemistry / Seley-Radtke K. L. – Academic Press: Elsevier, 2021. – С. 175-238.
7. Leporati A., Novikov M. S., Valuev-Elliston V. T., Korolev S. P., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N., Gupta S., Goding J., Bolotin E., Gottikh M. B., Bogdanov A. A. Hydrophobic-core PEGylated graft copolymer-stabilized nanoparticles composed of insoluble non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors exhibit strong anti-HIV activity // Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine. – 2016. – Т. 12, № 8. – С. 2405-2413.
8. Novikov M. S., Valuev-Elliston V. T., Babkov D. A., Paramonova M. P., Ivanov A. V., Gavryushov S. A., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. N-1,N-3-disubstituted uracils as nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2013. – Т. 21, № 5. – С. 1150-1158.
9. Babkov D. A., Valuev-Elliston V. T., Paramonova M. P., Ozerov A. A., Ivanov A. V., Chizhov A. O., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N., Balzarini J., Daelemans D., Pannecouque C., Seley-Radtke K. L., Novikov M. S. Scaffold hopping: Exploration of acetanilide-containing uracil analogues as potential NNRTIs // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2015. – Т. 23, № 5. – С. 1069-1081.

10. Matyugina E. S., Valuev-Elliston V. T., Babkov D. A., Novikov M. S., Ivanov A. V., Kochetkov S. N., Balzarini J., Seley-Radtke K. L., Khandazhinskaya A. L. 5'-Nor carbocyclic nucleosides: unusual nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // *MedChemComm.* – 2013. – T. 4, № 4. – C. 741-748.
11. Matyugina E. S., Valuev-Elliston V. T., Geisman A. N., Novikov M. S., Chizhov A. O., Kochetkov S. N., Seley-Radtke K. L., Khandazhinskaya A. L. Structure-activity evaluation of new uracil-based non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase // *MedChemComm.* – 2013. – T. 4, № 11. – C. 1443-1451.
12. Matyugina E., Valyev-Elliston V. T., Novikov M. S., Alexandrova L. A., Chernousova L. N., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L. New carbocyclic uracil derivatives as potential antiviral and antibacterial agents // *Febs Journal.* – 2013. – T. 280. – C. 358-359. **Тезисы**
13. Alzahrani K. J., Matyugina E. S., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N., Seley-Radtke K. L., de Koning H. P. Evaluation of the antiprotozoan properties of 5'-norcarbocyclic pyrimidine nucleosides // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2017. – T. 27, № 14. – C. 3081-3086.
14. Novikov M. S., Buckheit R. W., Temburnikar K., Khandazhinskaya A. L., Ivanov A. V., Seley-Radtke K. L. 1-Benzyl derivatives of 5-(arylamino)uracils as anti-HIV-1 and anti-EBV agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2010. – T. 18, № 23. – C. 8310-8314.
15. Alexandrova L., Zicari S., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Smirnova T., Andreevskaya S., Chernousova L., Vanpouille C., Kochetkov S., Margolis L. Dual-targeted anti-TB/anti-HIV heterodimers // *Antiviral Research.* – 2017. – T. 145. – C. 175-183.
16. Matyugina E., Novikov M., Babkov D., Ozerov A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Karpenko I., Chizhov A., Murthu P., Lutz S., Kochetkov S., Seley-Radtke K. L., Khandazhinskaya A. L. 5-Arylamino-uracil Derivatives: New Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis // *Chemical Biology & Drug Design.* – 2015. – T. 86, № 6. – C. 1387-1396.
17. Matyugina E. S., Novikov M. S., Babkov D. A., Valuev-Elliston V. T., Vanpouille C., Zicari S., Corona A., Tramontano E., Margolis L. B., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N. 5-Arylamino-uracil Derivatives as Potential Dual-Action Agents // *Acta Naturae.* – 2015. – T. 7, № 3. – C. 113-115.
18. Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. The synthesis and antituberculosis activity of 5'-nor carbocyclic uracil derivatives // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2012. – T. 20, № 22. – C. 6680-6686.
19. Klimenko A. A., Matyugina E. S., Logashenko E. B., Solyev P. N., Zenkova M. A., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L. Novel 5'-Norcarbocyclic Derivatives of Bicyclic Pyrrolo- and Furano[2,3-d]Pyrimidine Nucleosides // *Molecules.* – 2018. – T. 23, № 10. – C. 2654.
20. Khandazhinskaya A. L., Alexandrova L. A., Matyugina E. S., Solyev P. N., Efremenkova O. V., Buckheit K. W., Wilkinson M., Buckheit R. W., Chernousova L. N., Smirnova T. G., Andreevskaya S. N., Leonova O. G., Popenko V. I., Kochetkov S. N., Seley-Radtke K. L. Novel 5-Norcarbocyclic Pyrimidine Derivatives as Antibacterial Agents // *Molecules.* – 2018. – T. 23, № 12. – C. 3069.
21. Khandazhinskaya A. L., Matyugina E. S., Alexandrova L. A., Kezin V. A., Chernousova L. N., Smirnova T. G., Andreevskaya S. N., Popenko V. I., Leonova O. G., Kochetkov S. N. Interaction of 5-substituted pyrimidine nucleoside analogues and M.Tuberculosis: A view through an electron microscope // *Biochimie.* – 2020. – T. 171. – C. 170-177.
22. Khandazhinskaya A. L., Matyugina E. S., Solyev P. N., Wilkinson M., Buckheit K. W., Buckheit R. W., Chernousova L. N., Smirnova T. G., Andreevskaya S. N., Alzahrani K. J., Natto M. J., Kochetkov S. N., de Koning H. P., Seley-Radtke K. L. Investigation of 5'-Norcarbocyclic

- Nucleoside Analogues as Antiprotozoal and Antibacterial Agents // *Molecules*. – 2019. – Т. 24, № 19.
23. Матюгина Е. С., Кочетков С. Н., Хандажинская А. Л. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов как потенциальные химиотерапевтические агенты // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 74-79.
24. Khandazhinskaya A., Matyugina E., Shirokova E. Anti-HIV therapy with AZT prodrugs: AZT phosphonate derivatives, current state and prospects // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2010. – Т. 6, № 6. – С. 701-714.
25. Khandazhinskaya A., Yasko M., Shirokova E. The synthesis and antiviral properties of acyclic nucleoside analogues with a phosphonomethoxy fragment in the side chain // *Current Medicinal Chemistry*. – 2006. – Т. 13, № 24. – С. 2953-2980.
26. Khandazhinskaya A., Karpenko I., Frolova S., Kukhanova M., Jasko M., Yanvarev D., Shirokova E., Margolis L., Kochetkov S. AZT prodrugs: achievements and trends in the treatment and prevention of HIV infection // *Febs Journal*. – 2013. – Т. 280. – С. 365. **Тезисы**
27. Хандажинская А. Л., Широкова Е. А. 5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5, № 3 (18). – С. 57-65.
28. Khandazhinskaya A. L., Shirokova E. A., Karpenko I. L., Zakirova N. F., Tarusova N. B., Krayevsky A. A. P-(alkyl)-nucleoside 5'-hydrogenphosphonates as depot forms of antiviral nucleotide analogues // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2000. – Т. 19, № 10-12. – С. 1795-1804.
29. Широкова Е. А., Хандажинская А. Л., Тарусова Н. Б., Карпенко И. Л. Производные 5'-Н-фосфоната 3'-азидо-3'-дезокситимидина и фармацевтические композиции на их основе // **Патент РФ** №2187509, 20.08.2002, 2002.
30. Pokrovsky A. G., Pronayeva T. R., Fedyuk N. V., Shirokova E. A., Khandazhinskaya A. L., Tarusova N. B., Karpenko I. L., Krayevsky A. A. Anti-HIV activity of novel phosphonate derivatives of AZT, d4T, and ddA // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2001. – Т. 20, № 4-7. – С. 767-769.
31. Pokrovsky A., Pronayeva T., Fedyuk N., Plyasunova O., Gashnikova N., Khandazhinskaya A., Shirokova E. Novel anti-HIV prodrugs based on nucleoside phosphonate derivatives // *Antiviral Research*. – 2002. – Т. 53, № 3. – С. A69. **Тезисы**
32. Shirokova E. A., Jasko M. V., Khandazhinskaya A. L., Ivanov A. V., Yanvarev D. V., Skoblov Y. S., Mitkevich V. A., Bocharov E. V., Pronayeva T. R., Fedyuk N. V., Kukhanova M. K., Pokrovsky A. G. Uncharged AZT and D4T derivatives of phosphonoformic and phosphonoacetic acids as anti-HIV pronucleosides // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – Т. 47, № 14. – С. 3606-3614.
33. Широкова Е. А., Ясько М. В., Хандажинская А. Л., Иванов А. В., Январев Д. В., Скоблов Ю. С., Проняева Т. Р., Федюк Н. В., Покровский А. Г., Куханова М. К. Новые производные 3'-азидо-3'-дезокситимидина и фосфономуравьиной кислоты // *Биоорганическая химия*. – 2004. – Т. 30, № 3. – С. 273-280.
34. Shirokova E. A., Jasko M. V., Khandazhinskaya A. L., Yanvarev D. V., Skoblov Y. S., Pronayeva T. R., Fedyuk N. V., Pokrovsky A. G., Kukhanova M. K. New lipophilic derivatives of AZT and d4T 5'-phosphonates // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2003. – Т. 22, № 5-8. – С. 981-985.
35. Краевский А. А., Покровский А. Г., Проняева Т. Р., Федюк Н. В., Широкова Е. А., Хандажинская А. Л., Тарусова Н. Б., Иванов А. В., Карпенко И. Л. 2',3'-Дидегидро-2',3'-дидезокситимидин-5'[(этоксикарбонил)(этил)фосфонат]-ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека // **Патент РФ** №2188203, 27.08.2002, 2002.

36. Краевский А. А., Широкова Е. А., Хандажинская А. Л., Тарусова Н. Б., Иванов А. В., Карпенко И. Л., Покровский А. Г., Проняева Т. Р., Федюк Н. В. 5'-Замещенные производные 3'-азидо-3'-дезокситимидина и фармацевтические композиции на их основе // **Патент РФ** №2187509, 20.08.2002, 2002.
37. Покровский А. Г., Проняева Т. Р., Федюк Н. В., Широкова Е. А., Хандажинская А. Л., Ясько М. В., Январев Д. В., Куханова М. К. 5'-Аминокарбонилфосфонаты d4T -ингибиторы репродукции вируса иммунодефицита человека // **Патент РФ** №2247124, 27.02.2005, 2005.
38. Khandazhinskaya A. L., Yanvarev D. V., Jasko M. V., Shipitsin A. V., Khalizev V. A., Shram S. I., Skoblov Y. S., Shirokova E. A., Kukhanova M. K. 5'-Aminocarbonyl Phosphonates as New Zidovudine Depot Forms: Antiviral Properties, Intracellular Transformations, and Pharmacokinetic Parameters // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2009. – Т. 37, № 3. – С. 494-501.
39. Shirokova E. A., Khandazhinskaya A. L., Jasko M. V., Kukhanova M. K., Shipitsyn A. V., Pokrovsky A. G. Modified 5'-phosphonate azidothymidine - potential anti-viral preparations. // **Patent US** №7,999,099, 2011.
40. Ясько М. В., Шипицын А. В., Хандажинская А. Л., Широкова Е. А., Сольев П. Н., Плясунова О. А., Покровский А. Г. Новые производные алкил- и аминокарбонилфосфоновых кислот, содержащие 3'-азидо-3'-дезокситимидин // *Биоорганическая химия*. – 2006. – Т. 32, № 6. – С. 603-608.
41. Ясько М. В., Голубева Н. А., Шипицын А. В., Хандажинская А. Л., Бибилашвили Р. Ш., Кононов А. В. Способ получения 5'-аминокарбонилфосфонатов нуклеозидов и способ получения хлорангидрида триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты // **Патент РФ** №2446169, 27.03.2012, 2012.
42. Kukhanova M., Jasko M., Yanvarev D., Karpenko I., Shipitzyn A., Khandazhinskaya A. New Nucleoside and bis-Nucleoside-Phosphonate Conjugates: Design, Stability, and Anti-HIV Evaluation // *Antiviral Research*. – 2010. – Т. 86, № 1. – С. А60. **Тезисы**
43. Vanpouille C., Khandazhinskaya A., Karpenko I., Zicari S., Barreto-de-Souza V., Frolova S., Margolis L., Kochetkov S. A new antiviral: Chimeric 3TC-AZT phosphonate efficiently inhibits HIV-1 in human tissues ex vivo // *Antiviral Research*. – 2014. – Т. 109. – С. 125-131.
44. Khandazhinskaya A. L., Jasko M. V., Karpenko I. L., Solyev P. N., Golubeva N. A., Kukhanova M. K. 5'-Phosphonate Derivatives of 2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidine as New Anti-HIV Prodrugs // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2011. – Т. 78, № 1. – С. 50-56.
45. Бибилашвили Р. Ш., Волосюк Т. П., Карпенко И. Л., Кононов А. В., Куханова М. К., Мягков И., Хандажинская А. Л., Шипицын А. В., Ясько М. В. 5'-Фосфорсодержащие производные 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина новые противовирусные агенты // **Патент РФ** №2373218, 20.11.2009, 2009.
46. Куханова М. К., Хандажинская А. Л., Шипицын А. В., Ясько М. В., Бибилашвили Р. Ш., Волосюк Т. П., Голубева Н. А., Кононов А. В. Новые депо-формы зидовудина и ламивудина на основе производных фосфоновых кислот // **Патент РФ** №2430104, 27.09.2011, 2011.
47. Khandazhinskaya A. L., Mercurio V., Maslova A. A., Palomino R. A. Ñ., Novikov M. S., Matyugina E. S., Paramonova M. P., Kukhanova M. K., Fedorova N. E., Yurlov K. I., Kushch A. A., Tarasova O., Margolis L., Kochetkov S. N., Vanpouille C. Dual-targeted anti-CMV/anti-HIV-1 heterodimers // *Biochimie*. – 2021. – С. 169-180.
48. Novikov M. S., Babkov D. A., Paramonova M. P., Khandazhinskaya A. L., Ozerov A. A., Chizhov A. O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. Synthesis and anti-HCMV activity of 1- omega-(phenoxy)alkyl uracil derivatives and analogues thereof // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2013. – Т. 21, № 14. – С. 4151-4157.