

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

На правах рукописи

Хандажинская Анастасия Львовна

**НОВЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ
АНТИВИРУСНЫХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ**

Специальность: 1.5.3 - молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант
Академик РАН
Кочетков Сергей Николаевич

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР «ПРОИЗВОДНЫЕ УРАЦИЛА КАК НЕНУКЛЕОЗИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ» | 12 |
| 1.1. Введение | 12 |
| 1.2. 6-Замещенные производные урацила | 17 |
| 1.2.1. Производные 6-арилсульфанил- и 6-арилселенилурацила | 17 |
| 1.2.1.1. Эволюция структуры. | 17 |
| 1.2.1.2. Особенности синтеза 6-арилсульфанил- и 6-арилселенил- замещенных урацилов. | 20 |
| 1.2.2. 6-Бензил содержащие аналоги НЕРТ | 24 |
| 1.2.2.1. Эволюция структуры. | 24 |
| 1.2.2.2. Особенности синтеза 6-бензил-производных НЕРТ | 27 |
| 1.2.3. 6-Бензоил содержащие аналоги урацила | 29 |
| 1.2.3.1. Эволюция структуры. | 29 |
| 1.2.3.2. Особенности синтеза 6-бензоил содержащих аналогов урацила | 32 |
| 1.3. N ¹ -замещенные производные урацила | 34 |
| 1.3.1. Эволюция структуры. | 34 |
| 1.3.2. Синтез N ¹ -замещенных производных урацила | 38 |
| 1.4. 1,3-Дизамещенные урацилы. | 43 |
| 1.4.1. Эволюция структуры. | 43 |
| 1.4.2. Синтез 1,3-дизамещенных производных урацила | 46 |
| 1.5. Аналоги нуклеозидов в качестве ННИОТ ВИЧ | 50 |
| 1.5.1. Аналоги нуклеозидов с 3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''- диоксид)-модификацией углеводного фрагмента. | 50 |
| 1.5.2. 5'-Норкарбоциклические аналоги 2',3'-дидезокси-2',3'- дидегидроуридина | 55 |
| 1.6. Производные урацила с двойной активностью в отношении ВИЧ | 56 |
| 1.6.1. Ингибиторы обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ | 57 |
| 1.6.2. Ингибиторы полимеразной и рибонуклеазной активностей ОТ ВИЧ | 58 |
| 1.6.3. Ингибиторы РНКазы Н и интегразы ВИЧ | 59 |
| 1.6.4. Синтез производных урацила с двойной активностью в отношении ВИЧ | 60 |
| 1.7. Производные урацила, как ненуклеозидные ингибиторы различных вирусов | 61 |
| 1.7.1. Ингибиторы цитомегаловируса человека (HCMV) | 61 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 1.7.2. | Ингибиторы вируса гепатита С (HCV) | 64 |
| 1.7.3. | Ингибиторы вируса гепатита В (HBV) | 68 |
| 1.7.4. | Ингибиторы респираторно-синцитиального вируса (RSV) | 69 |
| 1.7.5. | Ингибиторы аденовируса человека (HAdV) | 70 |
| 1.7.6. | Ингибиторы SARS-CoV-2 | 70 |
| 1.7.7. | Жесткие амфипатические ингибиторы слияния: HCV, HSV-1, HSV-2, TBEV (Вирус клещевого энцефалита) и др. вирусы | 72 |
| 1.8. | Димеры ННИОТ и НИОТ | 73 |
| 1.9. | Заключение | 78 |
| 2. | ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 79 |
| 2.1. | 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов как НИОТ и ННИОТ ВИЧ | 79 |
| 2.1.1. | Динуклеозидтетрафосфонаты, динуклеозиддифосфонатдифосфаты и динуклеозиддифосфонатфосфаты 5'-норкарбоциклических аналогов пуриновых нуклеозидов как НИОТ ВИЧ | 80 |
| 2.1.1.1. | Синтез 5'-норкарбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов | 81 |
| 2.1.1.2. | Стабильность карбоциклических аналогов динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозидтетрафосфонатов в сыворотке крови человека | 88 |
| 2.1.1.3. | Биологическая активность карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов | 90 |
| 2.1.2. | Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила | 92 |
| 2.1.2.1. | Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенные по 4'-, 3-, 6- положениям. Синтез и оценка анти-ВИЧ активности | 93 |
| 2.1.2.2. | 5-Ариламинопроизводные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила. Синтез и оценка анти-ВИЧ и противотуберкулезной активности | 103 |
| 2.1.2.3. | Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенные по 5 положению. Синтез и оценка противотуберкулезной активности. | 108 |
| 2.2. | Депо-формы НИОТ ВИЧ | 121 |

| | |
|---|-----|
| 2.2.1. Эфиры 5'-Н-фосфонатов AZT и d ₄ T | 124 |
| 2.2.1.1. Синтез эфиров 5'-Н-фосфонатов AZT и d ₄ T | 124 |
| 2.2.1.2. Сравнительная оценка химической стабильности производных Н-фосфоната AZT и d ₄ T | 127 |
| 2.2.1.3. Анти-ВИЧ активность производных Н-фосфонатов AZT и d ₄ T | 128 |
| 2.2.2. Производные фосфоноформиатов AZT и d ₄ T | 128 |
| 2.2.2.1. Синтез производных фосфоноформиатов AZT и d ₄ T | 128 |
| 2.2.2.2. Анти-ВИЧ активность производных фосфоноформиатов AZT и d ₄ T | 132 |
| 2.2.2.3. Стабильность производных фосфоноформиатов AZT и d ₄ T | 133 |
| 2.2.3. Производные фосфоацетатов AZT и d ₄ T | 134 |
| 2.2.4. 5'-Аминокарбонилфосфонаты AZT | 135 |
| 2.2.4.1. Оптимизация синтеза 5'-аминокарбонилфосфоната AZT | 137 |
| 2.2.4.2. Исследование свойств 5'-аминокарбонилфосфоната AZT в клеточных культурах | 138 |
| 2.2.4.3. Исследование стабильности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT | 139 |
| 2.2.4.4. Исследование фармакокинетических параметров 5'-аминокарбонил-фосфоната AZT при однократном введении | 139 |
| 2.2.4.5. Исследование фармакокинетических параметров при многократном введении 5'-аминокарбонилфосфоната AZT | 143 |
| 2.2.4.6. Исследование распределения 5'-аминокарбонилфосфоната AZT в тканях | 143 |
| 2.2.4.7. Исследование токсичности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT | 144 |
| 2.3. Депо-формы НИОТ ВИЧ, способные высвободить два активных компонента. | 148 |
| 2.3.1. О-(L-2',3'-Дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат - гетеродимер, содержащий два нуклеозидных ингибитора ОТ ВИЧ | 148 |
| 2.3.1.1. Синтез О-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната | 149 |
| 2.3.1.2. Стабильность О-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната | 151 |
| 2.3.1.3. Исследования О-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната на культурах клеток | 152 |
| 2.3.2. Комбинированные противовирусные агенты против ВИЧ и HCMV | 154 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.2.1. Синтез гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 154 |
| 2.3.2.2. Исследование стабильности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 156 |
| 2.3.2.3. Исследование биологической активности гетеродимеров содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 157 |
| 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 162 |
| 3.1. Общие методы к разделу 2.1. | 162 |
| 3.1.1. Методики к разделу 2.1.1. | 162 |
| 3.1.1.1. Синтез карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов | 162 |
| 3.1.1.2. Оценка стабильности карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов | 172 |
| 3.1.1.3. Оценка биологической активности карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов | 173 |
| 3.1.2. Методики к разделу 2.1.2. | 173 |
| 3.1.2.1. Синтез производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, несущих модификации в 3,5,6 и/или 4' положениях. | 174 |
| 3.1.2.2. Синтез 5-ариламинопроизводных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила. | 184 |
| 3.1.2.3. Синтез производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенных по 5 положению | 188 |
| 3.2. Методики к разделу 2.2. | 198 |
| 3.2.1.1. Синтез эфиров <i>H</i> -фосфонатов AZT и d ₄ T | 198 |
| 3.2.1.2. Оценка химической стабильности эфиров <i>H</i> -фосфонатов AZT и d ₄ T | 203 |
| 3.2.1.3. Исследование антивирусных свойств эфиров <i>H</i> -фосфонатов AZT и d ₄ T | 203 |
| 3.2.2. Синтез производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d ₄ T | 203 |
| 3.2.3. Оценка стабильности производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d ₄ T | 213 |
| 3.2.4. Оценка антивирусных свойств производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d ₄ T | 214 |
| 3.2.5. Оптимизация синтеза 5'-аминокарбонилфосфоната AZT | 214 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.6. Доклинические испытания 5'-аминокарбонилфосфоната AZT на животных моделях | 220 |
| 3.3. Методики к разделу 2.3. | 223 |
| 3.3.1. О-(L-2',3'-Дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат | 223 |
| 3.3.1.1. Синтез | 223 |
| 3.3.1.2. Оценка стабильности | 225 |
| 3.3.1.3. Исследование биологических свойств | 225 |
| 3.3.2. Комбинированные противовирусные агенты против ВИЧ и HCMV | 226 |
| 3.3.2.1. Синтез гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 226 |
| 3.3.2.2. Исследование стабильности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 229 |
| 3.3.2.3. Исследование биологической активности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ HCMV | 229 |
| ВЫВОДЫ | 230 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 232 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 236 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из основных задач физико-химической биологии и медицинской химии 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 фармако-кинетических параметров, снизить токсичность и кратность приема препарата и т.п.

В своей работе 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. Литературные данные по методам синтеза карбоциклических аналогов нуклеозидов[1, 2] и подходам к созданию депо-форм нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ[3, 4] обобщены нами в обзорах, опубликованных ранее. В данной работе в качестве обзора литературы представлен анализ данных о ненуклеозидных ингибиторах ОТ ВИЧ-1, содержащих урацильный фрагмент, описаны наиболее удачные пути их синтеза и обнаруженные закономерности влияния структуры на активность в отношении ВИЧ-1 и других 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 введенного заместителя;
- 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 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 ненуклеотидными ингибиторами ОТ.

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-тетрадецилилурацила, полностью подавляющие рост *M.tuberculosis* в концентрации 5-40 мкг/мл. 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 нуклеотидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1 или нуклеотидного ингибитора ОТ ВИЧ-1 и ненуклеотидного ингибитора HCMV и высвобождающие 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 – нуклеозидных 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 нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1.
2. Впервые показана способность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов эффективно ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе штамм 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 высвободить в инфицированной клетке два активных антивирусных компонента.

Степень достоверности результатов. В работе использовали современные методы органической химии, 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.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР «ПРОИЗВОДНЫЕ УРАЦИЛА КАК НЕНУКЛЕОЗИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВИЧ-1 И ДРУГИХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ»

1.1. Введение

Согласно последним данным Программы ООН по ВИЧ/СПИД (UNAIDS) и Всемирной организации здравоохранения в 2020 году общее количество инфицированных вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) составляло около 38 миллионов, и эта цифра увеличивается примерно на 700 тысяч человек каждый год[5]. При этом синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызываемый ВИЧ, остается опаснейшим и широко распространенным заболеванием: на сегодняшний день он унес более 36 миллионов человеческих жизней. Применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) позволило за последние 15 лет снизить смертность от причин, связанных с ВИЧ, вдвое. Однако и сейчас в мире умирает около 700 тысяч человек ежегодно[5].

Интенсивное изучение структурных и функциональных особенностей ВИЧ в течение нескольких десятилетий[6-10] привело к появлению лекарств, действующих на различные мишени[11], такие как ферменты ВИЧ (обратная транскриптаза, протеаза и интегразы) и факторы клетки-хозяина, критические для ВИЧ-инфекции (например, CD4 и CCR5).

Обратная транскриптаза (ОТ) ВИЧ (КФ 2.7.7.49) относится к группе ДНК-полимераз, обладает РНК- и ДНК-зависимой полимеразной и рибонуклеазной активностью и играет ключевую роль в репродукции вируса[11]. ОТ использует в качестве субстратов клеточные 2'-дезоксинуклеозид 5'-трифосфаты, но по субстратной специфичности существенно отличается от полимераз человека. Именно на этот фермент был нацелен первый анти-ВИЧ препарат Зидовудин (азидотимидин, AZT). До сих пор большинство лекарств, применяемых в терапии ВИЧ-инфекции и СПИДа, ингибируют процесс синтеза провирусной ДНК, катализируемый ОТ ВИЧ. Пространственная структура ОТ напоминает по форме правую руку с субдоменами, получившими названия «ладонь», «пальцы» и «большой палец» (рис.1)

Известны два класса ингибиторов ОТ: нуклеозидные ингибиторы ОТ ВИЧ-1 (НИОТ) и ненуклеозидные ингибиторы ОТ ВИЧ-1 (ННИОТ). НИОТ являются аналогами природных нуклеозидов и механизм их действия состоит в терминации элонгации вирусной ДНК. Подавление репродукции вируса осуществляется следующим образом: ингибитор проникает в клетку, проходит стадии фосфорилирования клеточными

киназами до 5'-трифосфатной формы, связывается с полимеразным центром (рис. 2) и включается в вирусную ДНК при помощи ОТ, что приводит к блокированию дальнейшей элонгации.

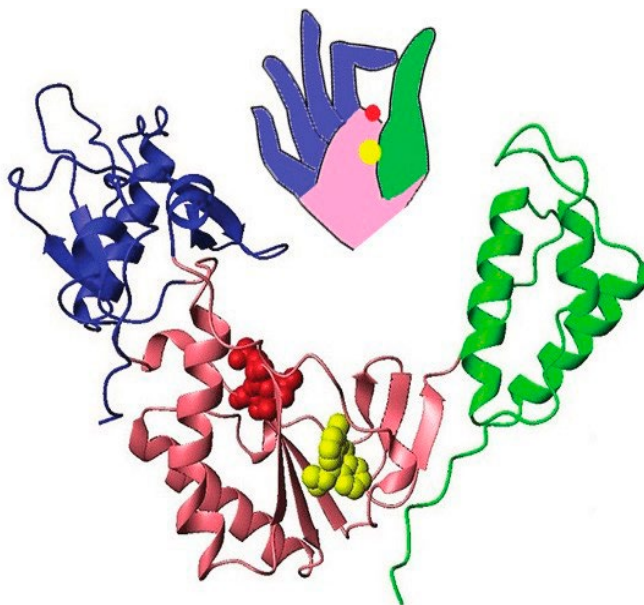


Рисунок 1. Трехмерная структура обратной транскриптазы ВИЧ-1. Конформация «правой руки», представляющая субдомены «пальцев» (синий), «ладони» (светло-красный) и «большого пальца» (зеленый), а также активный сайт фермента (красный) и ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (желтый) в сайте связывания[12]

5'-Трифосфаты нуклеозидов, плохо проникают в клетки и обладают низкой катаболической устойчивостью, поэтому в качестве лекарств используются аналоги нуклеозидов, которые должны пройти внутриклеточное фосфорилирование, прежде чем встроиться в растущую цепь ДНК и терминировать синтез. Эффективность такого фосфорилирования низка (0,1% для 3'-азидо-3'-дезокситимидина), поэтому весьма перспективными являются фосфорилированные формы нуклеозидов, которые позволяют сократить цикл фосфорилирования или не зависят от него вообще. Такие нуклеотидные аналоги должны селективно подавлять действие обратной транскриптазы ВИЧ, минимально затрагивая клеточные ферменты, и в то же время должны быть достаточно стабильны к действию дефосфорилирующих ферментов плазмы крови. Этим условиям могут отвечать нуклеотидные аналоги, содержащие одну или несколько фосфонатных групп. Известно, что фосфонатные группы по ряду свойств близки к фосфатным, но

отличаются повышенной стабильностью. Ярким примером нуклеотидного анти-ВИЧ препарата, содержащего фосфонатный фрагмент, является тенофовир[13].

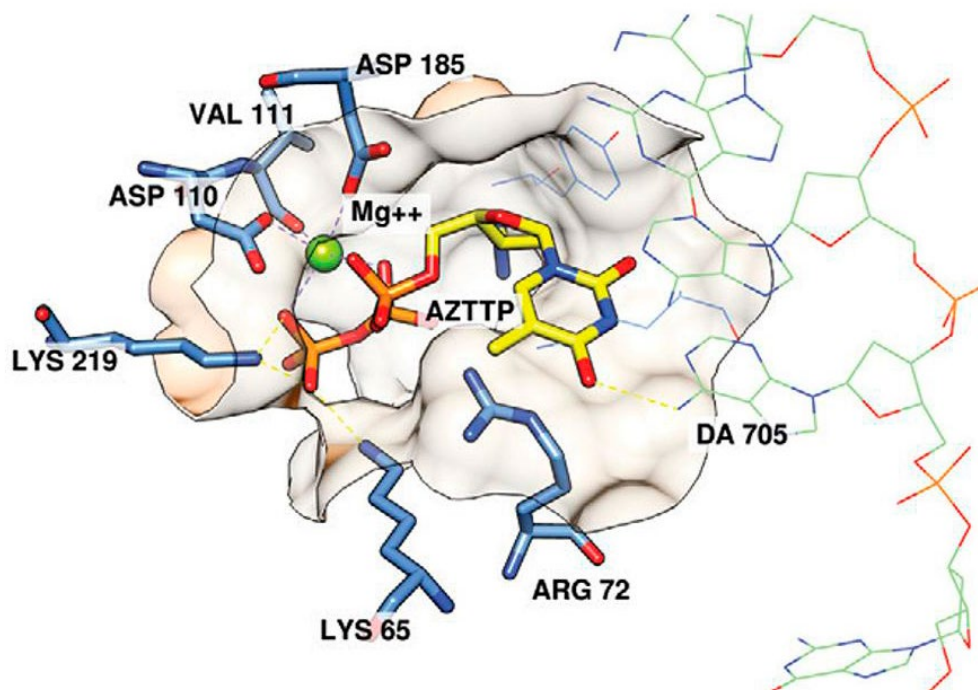


Рисунок 2. 5'-Трифосфат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Зидовудин, AZT) в сайте связывания нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ [PDB code: 3V41][14]

ННИОТ ВИЧ-1, в отличие от нуклеозидных ингибиторов, попадая в клетку, не участвуют в клеточных метаболических процессах. Они связываются с гидрофобным «карманом» ОТ ВИЧ-1, приблизительно в 10 Å от активного сайта ОТ (рис. 3), изменяют конформацию активного центра и тем самым эффективно подавляют вирусную репликацию[15, 16].

В настоящее время для лечения ВИЧ- инфекции успешно используют пять ННИОТ: доравирин, эфавиренц, этравирин, невирапин, рилпривирин[17, 18]. Ненуклеозидные ингибиторы эффективны при использовании в комбинации с высокоактивными нуклеозидными ингибиторами ОТ ВИЧ-1 и как дополнительные анти ВИЧ-1 агенты в лечении пациентов, ранее не получавших ВААРТ. Главным недостатком ННИОТ ВИЧ-1 является быстрое возникновение резистентных штаммов вируса и доза-зависимые побочные эффекты, такие как папулезные высыпания и др. Репродукция ВИЧ-1 в клеточной культуре в присутствии ННИОТ приводит к быстрому отбору устойчивых форм вируса. Высокий уровень специфичности взаимодействия подобных соединений с

гидрофобным сайтом связывания ОТ ВИЧ-1 приводит к образованию мутаций в «кармане» ННИОТ и частичной или полной потере ингибирующего действия соединений.

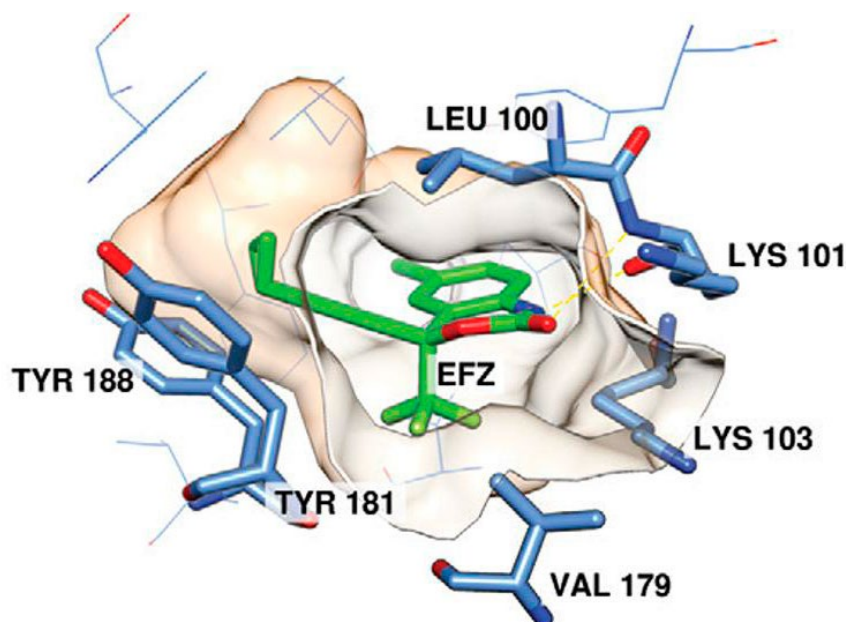


Рисунок 3. Эфавиренц (EFZ) (зеленый) в аллостерическом сайте связывания ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ [PDB code: 1 FK9] [19]

Гетероциклические основания в составе нуклеозидов и нуклеотидов, помимо их очевидной значимости в качестве важнейших компонентов ДНК и РНК, принимают также участие в огромном количестве ключевых метаболических процессов, играя роль кофакторов или регуляторов сотен реакций самых разных типов [20]. В связи с этим любые модификации нуклеинового основания могут оказывать существенное влияние на узнавание и ингибирование соответствующих ферментов, и, таким образом, на спектр биологической активности полученных производных [20-22]. В настоящий момент аналоги и производные гетероциклических оснований, нуклеозидов и нуклеотидов являются важными элементами противораковой [20, 21, 23], антибактериальной [24, 25], противогрибковой [26, 27] и противовирусной терапии [20-22, 28, 29].

Противовирусная активность производных пиримидиновых оснований была впервые описана в 1963 году, когда было показано, что 2'-дезоксидидитидин ингибирует развитие герпесвирусной инфекции [30]. Пиримидин-содержащие аналоги нуклеозидов стали первыми препаратами для лечения инфекций, вызванных ВИЧ-1 и до сих пор используются в терапии. Зидовудин (AZT) [31], ставудин

[32], ламивудин[33, 34] и эмтрицитабин[35] являются нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1. Пиримидин-содержащие аналоги компонентов нуклеиновых кислот также широко используются для лечения инфекций, вызванных вирусами группы герпеса, в частности: бривудин против вируса варицелла-зостера[36] и цидофовир против цитомегаловируса[37]. Основной механизм антивирусной активности нуклеозидных ингибиторов заключается во внутриклеточном фосфорилировании до соответствующих аналогов нуклеозидтрифосфатов, которые затем выступают в качестве терминаторных субстратов вирусных полимераз[20].

Позже было обнаружено, что производные урацила способны ингибировать ОТ ВИЧ-1 по неконкурентному (ненуклеозидному) механизму. ННИОТ ВИЧ-1 связываются с вирусным ферментом в гидрофобном кармане ОТ и нарушают необходимую для полимеризующей активности конформацию ОТ[15, 16]. За последние три десятилетия синтезировано более полутора тысяч урацил-содержащих ННИОТ ВИЧ, опубликовано более ста работ, причем каждая научная группа оптимизирует свой тип ингибиторов. Однако полученные данные в значительной степени остаются разрозненными и зачастую противоречивыми. Наиболее известные типы ННИОТ ВИЧ, содержащие урацил, упоминаются в обзорах, посвященных различным аспектам исследований различных ННИОТ ВИЧ[16, 38-41].

Со временем стало ясно, что помимо ингибирования ОТ ВИЧ с помощью нуклеозидных и ненуклеозидных механизмов, производные урацила могут ингибировать активность РНКазы Н и интегразы (ИН) ВИЧ. Кроме того, производные урацила оказались эффективными ННИ других вирусов. Некоторые из них, например вирусы семейств герпеса (HCMV и HSV) и гепатита (HCV и HBV), являются широко распространенными коинфекциями ВИЧ и хорошо изучены. Другие вирусы, такие как респираторно-синцитиальный вирус (RSV), аденовирус человека (HAdV), вирус клещевого энцефалита (TBEV) и SARS-CoV-2, менее изучены, и против них пока нет высокоэффективных и селективных препаратов.

Настоящий обзор посвящен систематизации данных об эволюции различных типов урацил-содержащих ННИ за 30 лет, обсуждению удачных подходов к дизайну и синтезу, а также обобщению обнаруженных закономерностей влияния структуры на активность в отношении ВИЧ-1 и других вирусных инфекций. В отдельных разделах описаны аналоги нуклеозидов, которые действуют как ННИОТ ВИЧ-1, и димерные молекулы, содержащие активные компоненты, направленные на ингибирование различных вирусных мишеней.

1.2. 6-Замещенные производные урацила

1.2.1. Производные 6-арилсульфанил- и 6-арилселенилурацила

1.2.1.1. Эволюция структуры.

1-(2-Гидроксиэтоксиметил)-6-(фенилтио)тимин **1** (НЕРТ; рис. 4) был синтезирован Х. Танака и Т. Миясака из Университета Сева (Токио, Япония) и тестирован на анти-HSV активность в Рега-Институте (Левен, Бельгия) в 1987 году. Идея этой работы опиралась на структурное сходство НЕРТ с ацикловиром, известным анти-HSV препаратом, который также имел в своем составе 2-гидроксиэтоксиметильную боковую цепь. Активности в отношении HSV у НЕРТ обнаружено не было. Однако, затем Масанори Баба (Медицинский колледж Фукусимы, Япония) обнаружил, что НЕРТ активен в отношении ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4, но не ингибирует ВИЧ-2[42]. Изучение механизма действия НЕРТ показало, что в отличие от других аналогов нуклеозидов, трифосфат НЕРТ не взаимодействует с обратной транскриптазой ВИЧ-1 и не оказывает влияние на репликацию ВИЧ-1[43].

Механизм действия НЕРТ стал проясняться после того, как были синтезированы дополнительные более мощные производные НЕРТ, такие как 1-бензилоксиметил-5-этил-6-фенилтиоурацил **2** (E-BPU)[44], 1-этил-1-этоксиметил-6-(3,5-диметилфенилтио)урацил **3** (E-EPU-dM) и 1-бензилоксиметил-5-этил-6-(3,5-диметилфенилтио)урацил **4** (E-BPU-dM)[45, 46]. В культуре клеток МТ-4 эти соединения в наномолярном диапазоне концентраций подавляли репликацию ВИЧ-1 как дикого штамма, так и многочисленных его вариантов, включая резистентный к действию классического НИОТ ВИЧ-1 зидовудина (AZT). Было показано, что соединения ингибируют ОТ ВИЧ-1, но не активны в отношении ОТ ВИЧ-2[47].

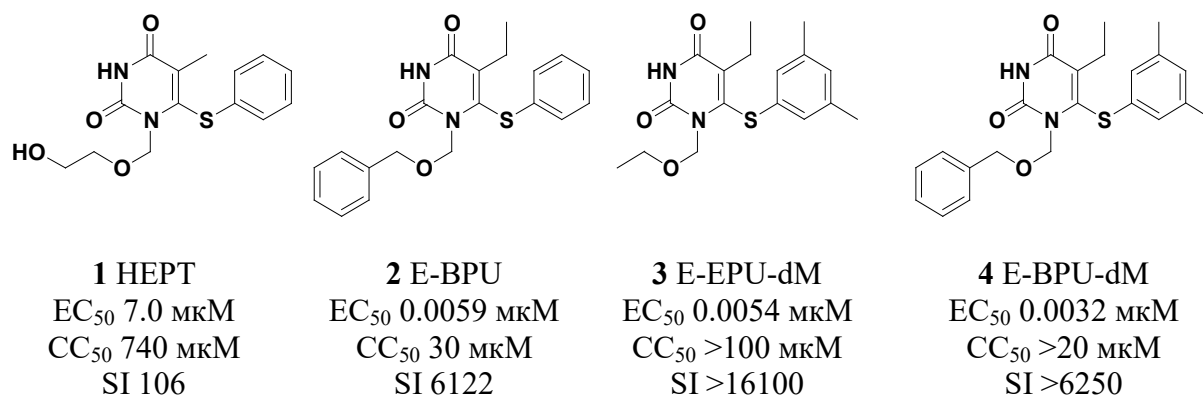


Рисунок 4. Структуры и свойства соединений **1-4**

Изучение резистентных к производным НЕРТ вариантов ВИЧ-1 показало, что они содержали одну из трех мутаций в положениях 188-Tyr > His, 181-Tyr > Cys или 106-Val > Ala в обратной транскриптазе ВИЧ-1. Эти штаммы вируса показали заметно более низкую чувствительность к производным НЕРТ. Более того, штаммы вируса, устойчивые к НЕРТ, также оказались перекрестно устойчивыми практически ко всем другим ненуклеозидным ингибиторам ВИЧ-1[48]. Таким образом, было показано, что производные НЕРТ связываются с аллостерическим сайтом обратной транскриптазы, расположенным в непосредственной близости от активного центра фермента и функционально связанным с ним.

Вышеописанная эволюционная линия НЕРТ дала несколько ответвлений. В частности, описан синтез и противовирусные свойства аналогов, модифицированных по арильному фрагменту в положении 6 урацила. Так аналог E-BPU **2** – 1-бензилоксиметил-5-этил-6-(α -пиридилтио)урацил **5** (рис. 5) блокировал репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток СЕМ-1W в концентрации 0.9 нМ и имел индекс селективности более 1100[49]. 6-Циклогексилтио-1-этоксиметил-5-изопропилаурацил **6** (TNK-6123, рис. 5) ингибировал репликацию вируса в концентрации 3 нМ и имел индекс селективности почти 25 000[50].

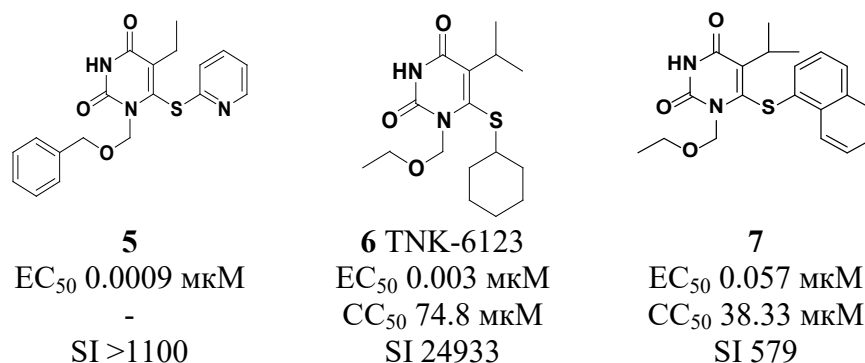


Рисунок 5. Структуры и свойства соединений **5-7**

6-(2-Нафтилтио)-1-этоксиметил-5-изопропилаурацил **7** (рис. 5) и его аналоги с различными заместителями в нафтильном фрагменте и модификациями по 1-му и 5-му положениям существенно уступали в антивирусной активности производным **5** и **6**[51].

Замена атома серы в НЕРТ на атом селена дала ответвление селен-содержащих ННИОТ. Так 1-[(2-гидроксиэтокси)метил]-6-(фенилселененил)тимин **8** (рис. 6) в концентрации 0,96 мМ ингибировал цитопатический эффект ВИЧ-1 (штамм LAV) в культуре РВМ-клеток на 50% и его индекс селективности превышал 200. В этой же культуре клеток НЕРТ имел EC₅₀ 5,30 мМ. Кроме того в отличие от 6-фенилтиоаналогов

6-(фенилселененил)производные урацила проявили выраженный противовирусный эффект в отношении ВИЧ-2. Так, EC_{50} соединения **8** в культуре РВМ-клеток, инфицированных ВИЧ-2 (штамм ROD-2) составила 25,6 μ М, а индекс селективности был равен 7. Изучение механизма действия при использовании в качестве темплейт-праймера поли(гА)-олиго(дТ) показал, что в отличие от НЕРТ **1** и его 6-(фенилтио)аналогов **2-4**, Se-НЕРТ **8** оказывает слабый эффект на вирусный фермент в концентрации IC_{50} 90,3 μ М.

Изучение цитотоксических свойств соединений данного ряда показало, что Se-НЕРТ **8** и его аналоги не проявляют цитотоксичности в культуре РВМ-клеток, но некоторые из них имеют заметную цитотоксичность в культуре клеток Vero[52]. Это говорит о том, что 6-фенилселененильные производные урацила могут проявлять токсичность в быстро делящихся клетках, таких как клетки костного мозга человека и оказывать негативный эффект на процесс кроветворения[53].

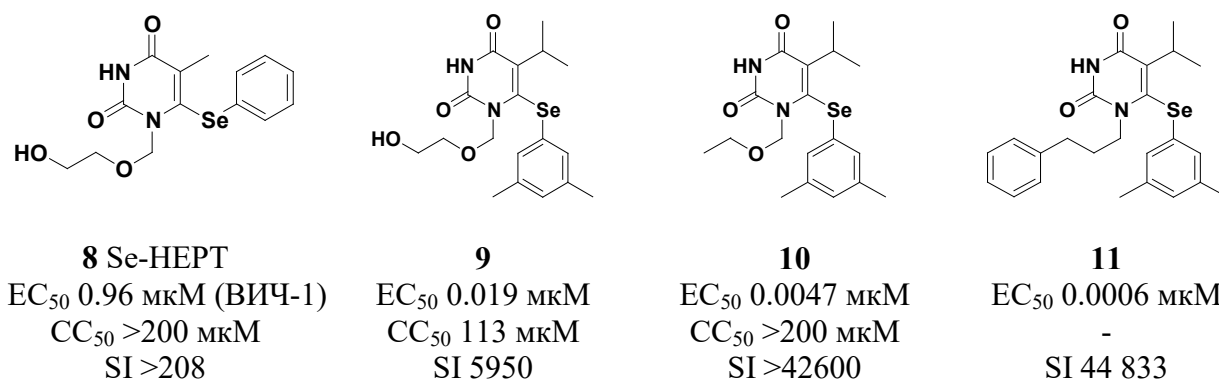


Рисунок 6. Структуры и соединений **8-11**

Введение изопропильного заместителя в положение 5 и метильных групп в *мета*-положения фенильного кольца усиливают противовирусные свойства. Так, 6-[(3,5-диметилфенил)селенил]-1-[(2-гидроксиэтокси)метил]-5-изопропилаурацил **9** (рис. 6) в концентрации 19 нМ на 50% ингибировал цитопатический эффект ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток и его индекс селективности был равен 5950. Отсутствие в боковой цепи гидроксильной группы также усиливало анти-ВИЧ-1 свойства. Так, 6-[(3,5-диметилфенил)селенил]-1-этоксиметил-5-изопропилаурацил **10** (рис. 6) в концентрации 0,0047 мкМ защищал на 50% СЕМ-SS клетки от цитопатического эффекта ВИЧ-1 и его индекс селективности превысил 42600[54].

Однако для 6-арилселененил-производных урацила в культуре клеток МТ-2 было показано быстрое возникновения резистентности ВИЧ-1 (штамм ПТВ). Анализ

последовательности ДНК мутантных вариантов показал, что причиной устойчивости является единичная точечная замена (ТАТ → ТГТ) в гене ОТ, приводящая к замещению Туг на Cys или в позиции 181, или в позиции 188 ОТ ВИЧ-1[55].

Ким и соавторы[56] описали синтез и ингибиторные свойства 6-арилселенил-производных урацила, содержащих в качестве заместителя у атома азота N¹ бутильный или 3-фенилпропильный заместитель. Было обнаружено, что производные 5-изопропилаурацила более эффективно блокируют репродукцию ВИЧ-1, чем производные 5-этилаурацила. Наиболее активным соединением этого ряда явился 1-(3-фенилпропил)-5-изопропил-6-(3,5-диметилфенилселенил)урацил **11** (рис. 6), который в концентрации 0,0006 мМ защищал на 50% клетки от цитопатического эффекта ВИЧ-1 и имел индекс селективности 44833.

1.2.1.2. Особенности синтеза 6-арилсульфанил- и 6-арилселенил-замещенных урацилов.

Методы синтеза 6-тио- и 6-селенилпроизводных урацила, описанных в данном разделе, во многом схожи. Существует три основных стратегии синтеза:

- введение арилсульфанильного и арилселенильного фрагмента через дилитиевую соль урацила;
- применение 2-тиоурацила как субстрата для введения арилсульфанильного и арилселенильного фрагмента;
- замыкание пиримидинового цикла.

Ключевой стадией синтеза 6-тио- и 6-селенилпроизводных урацила в первом подходе является обработка соответствующего производного урацила избытком диизопропиламида лития (LDA) при пониженной температуре, и последующая реакция полученной дилитиевой соли с диарилдисульфидом или диарилдиселенидом.

Один из методов получения НЕРТ (**1**) включает четыре стадии (схема 1). Первая из них заключается в реакции исходного 1-[(2-гидроксиэтокси)метил]пиримина **13** с *трет*-бутилдиметилсилилхлоридом (TBDMSCl) в растворе ДМФА в присутствии имидазола. Образующийся при этом силильный эфир **14** обрабатывают 2.5-кратным избытком LDA в ТГФ при –70°C, что приводит к дилитиевой соли **15**. Взаимодействие последней с 2-кратным мольным избытком дифенилдисульфида ведёт к образованию 6-(фенилтио)-производного **16** с выходом 90%, кислотный гидролиз которого даёт целевой НЕРТ (**1**). Соединение **12** получали из соответствующих исходных тем же путем[42, 57]. Аналогично

синтезировали и 6-(арилселенил)производные урацила. Так, для получения 1-[(2-гидроксиэтокси)метил]-6-(фенилселенил)тимина **8** к дилитиевому интермедиату **15** добавляли дифенилдиселенид, что приводило к образованию 6-(фенилселенил)-производного **16** с выходом 82%. Удаление защитной группы позволило получить целевой продукт **8**, общий выход которого составил 55%[53].

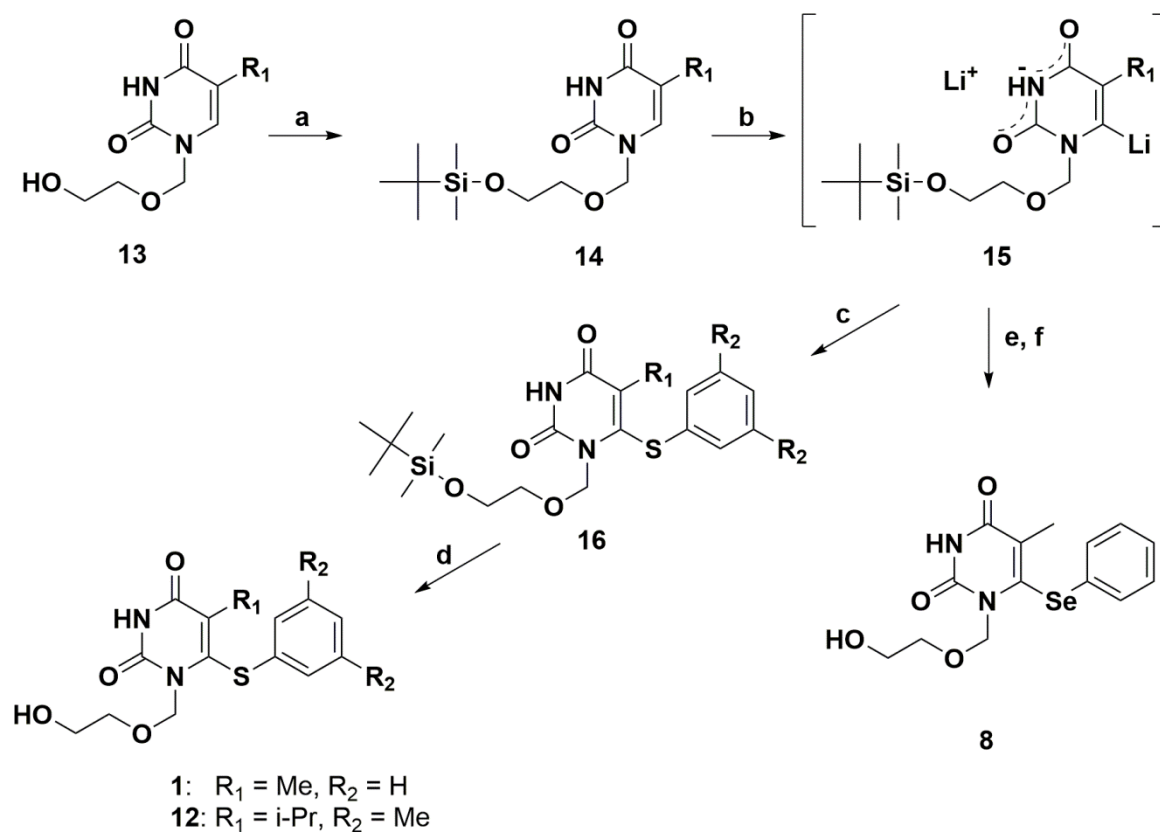


Схема 1. Условия и реагенты: а) TBDMSCl, ДМФА, имидазол, rt, 14 ч; б) LDA, ТГФ, -70°C, 1 ч; в) ArSSAr, ТГФ, -70°C, 1 ч, 90%; д) ТГФ, H₂O, AcOH; е) PhSeSePh, ТГФ, -78°C, 30 мин, 82%; ф) тетра-*n*-бутиламмоний фторид, ТГФ, rt, 30 мин, 75%.

В случае синтеза 1-(алкоксиметил)- и 1-(бензилоксиметил)производных **2** и **3** схема синтеза упрощается (схема 2), поскольку заместитель в N-1 положении урацила не содержит реакционно-способных групп[46]. 1-(Бензилоксиметил)-6-(фенилсульфанил)тимин (R₁ = Ph, R₂ = CH₃, R₃ = H) получали литированием исходного 1-(бензилоксиметил)тимина с последующим введением фенилсульфанильного фрагмента с выходом 58%. Однако, в условиях этого метода соединения **2**, **3** и **4** с этильным заместителем в положении 5, а также 5-изопропилсодержащие соединения, образуются с низкими выходами[46].

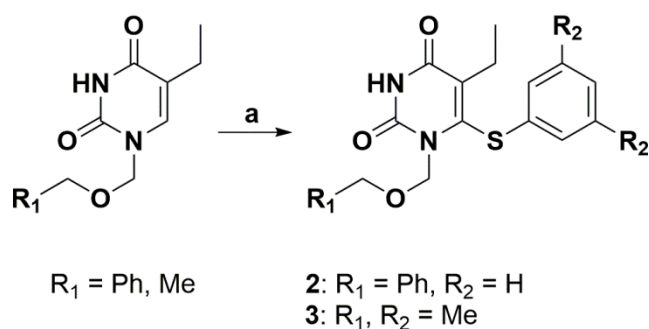


Схема 2. Условия и реагенты: а) LDA, ТГФ, -70°C , 1 ч, затем ArSSAr, ТГФ, -70°C , 1 ч.

Обработка 1-(бензилоксиметил)-5-этилурацила α, α' -дипиридилдисульфидом в тех же условиях приводила к образованию соединения **5** с выходом 43% (схема 3), а α, α' -дипиридилдиселенидом к селен-содержащему производному **17** с выходом 40%[49].

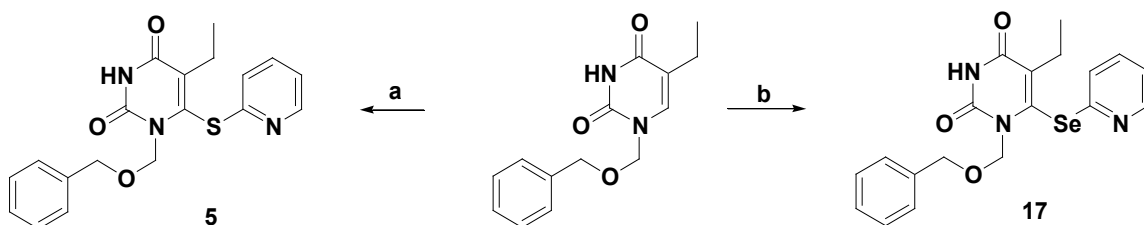


Схема 3. Условия и реагенты: а) LDA, ТГФ, -78°C , 1 ч, затем α, α' -дипиридилдисульфид, -78°C , 1 ч, 43%; б) LDA, ТГФ, -70°C , 1 ч, затем α, α' -дипиридилдиселенид, -78°C , 1 ч, 40%.

На выход продуктов замещения по положению 6 существенное влияние оказывает наличие заместителя в положении 5 пиримидинового цикла. Алкильные заместители в значительной степени понижают выход, очевидно, за счёт стерического и электронного эффектов. Однако использование 5-замещенных 2-тиоурацилов позволяет существенно увеличить выход как 5-алкил-6-фенилсульфанил-замещенных продуктов, так и соответствующих 6-арилселеновых производных. На схеме 4 приведен пример синтеза 1-((2-гидроксиэтокси)метил)-5-(изопропил)-6-(3,5-диметилфенилсульфанил)урацила **18** с общим выходом 20%[58]. 1-(Бензилоксиметил)-5-этил-6-(фенилсульфанил)урацил **2**, 1-(этоксиметил)-5-этил-6-(3,5-диметилфенилсульфанил)урацил **3**, 1-(бензилоксиметил)-5-этил-6-(3,5-диметилфенилсульфанил)урацил **4**[46] и 1-(этоксиметил)-5-(изопропил)-6-(3,5-диметилфенилселенил)урацил **10**[54] получали аналогично, выход в расчете на исходный 5-изопропил-2-тиоурацил также был около 20%.

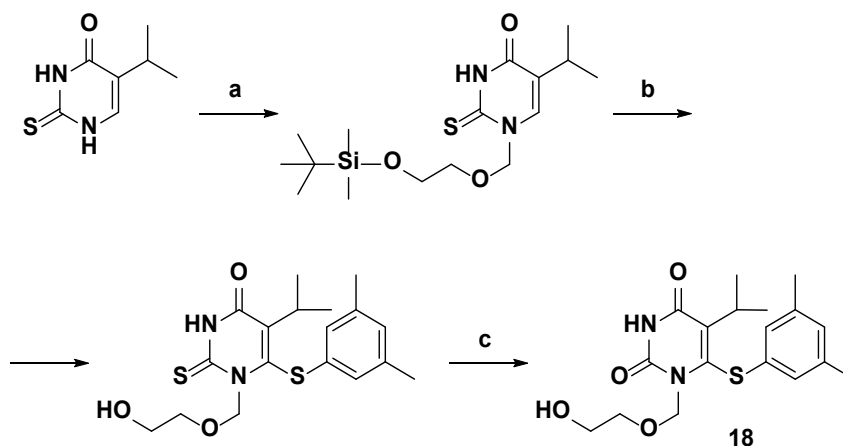


Схема 4. Условия и реагенты: а) (i) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кипячение, 15 ч; (ii) (2-ацетоксиэтокс)метилацетат, CsI, кипячение, 2 ч; (iii) 1 N NaOH, MeOH, rt, 3 ч; (iv) TBDMSCl, MeCN, имидазол, rt, 14 ч, 38%; б) (i) LDA, ТГФ, -70°C , 1 ч; (ii) ArSSAr , ТГФ, -70°C , 1 ч; (iii) ТГФ, конц. HCl, rt, 61%; в) 1N NaOH, 35% H_2O_2 , 1 ч, 84%.

На схеме 5 представлен пример синтеза 1-алкил- и арилалкил-замещенных 6-арилселенил-5-алкилурацилов методом достройки пиримидинового кольца[56]. На первой стадии щелочным гидролизом этилового эфира 3,3-ди(метилтио)акриловой кислоты **19** в водно-спиртовой среде получают карбоновую кислоту **20**. Затем, действием оксалил хлорида, кислоту **20** превращают в хлорангидрид **21**, который в растворе бензола обрабатывают изоцианатом серебра. Полученный изоцианат **22** реагирует с 3-фенилпропиламином, что приводит к соответствующему уреиду **23**. Его циклизация в растворе уксусной кислоты в присутствии каталитического количества метансульфокислоты дает 1-(3-фенилпропил)-5-изопропил-6-метилсульфанилурацил **24**, который окисляют *m*-хлорпербензойной кислотой до соответствующего сульфона **25**. Его обработка 3,5-диметилфенилселенолом в спиртовом растворе NaOH приводит к целевому соединению **11**[56].

Более подробно синтез 6-арилсульфанил- и 6-арилселенил-замещенных урацилов описан в обзоре [59].

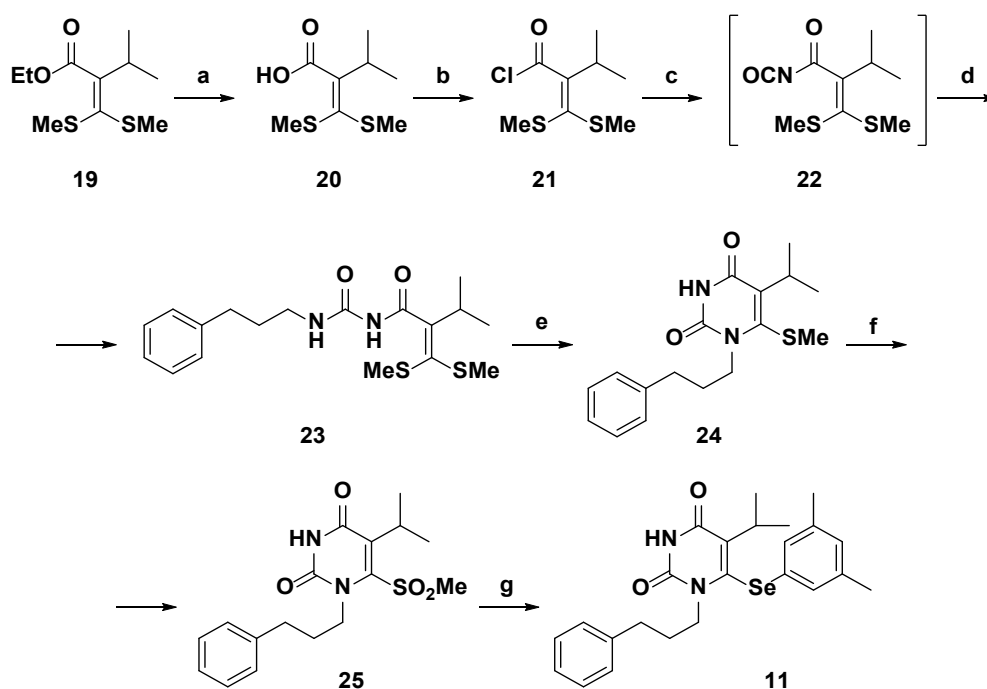


Схема 5. Условия и реагенты: а) 2N KOH, EtOH, кипячение, 3 ч, 82%; б) $(\text{COCl})_2$, ДМФА (кат.), бензол, N_2 , rt, 3 ч, 91%; в) AgOCN , бензол, кипячение, N_2 , 30 мин; д) $\text{Ph}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, -78°C до rt, 1 ч, 88%; е) MeSO_3H , AcOH , 80°C, 1 ч, 86%; ф) *m*-CPBA, бензол, кипячение, 16 ч; г) 3,5-диметилфенилселенол, NaOH , EtOH, rt, N_2 , 2 ч, 98%.

1.2.2. 6-Бензил содержащие аналоги HEPT

1.2.2.1. Эволюция структуры

Последующие исследования закономерности структура-активность привели к 6-бензил-1-этоксиметил-5-изопропилаурацил **26** (МКС-442, рис. 7)[60]. МКС-442 достиг фазы III расширенных клинических испытаний в качестве анти-ВИЧ-1 препарата, но его разработка была остановлена без объявления причин.

1-Этоксиметил-5-изопропил-6-(1-нафтилметил)урацил **27** (рис. 7) существенно уступал **26** (МКС-442). Соединение подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре МТ4-клеток (EC_{50} 0,017 μM и SI 2229) и в культуре СЕМ-клеток (EC_{50} 0,042 мкМ и SI 480)[61].

6-(3,5-Диметилбензил)-1-(этоксиметил)-5-изопропилаурацил **28** (I-EPU-dM, GSA-186, рис. 7) в культуре клеток МТ-4 проявил более высокую активность в отношении ВИЧ-1, чем соединение **26** (МКС-442) и блокировал репликацию вируса в концентрации менее 1 нМ[62].

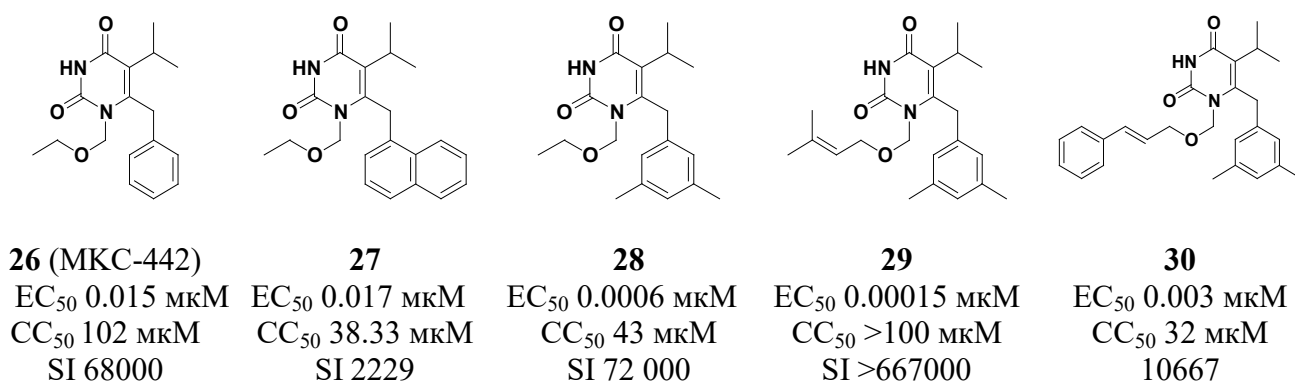


Рисунок 7. Структуры и соединений **26-30**

Дальнейшая эволюция аналогов НЕРТ затронула модификации боковой цепи при атоме азота N¹ урацила и привела к 6-(3,5-диметилбензил)-5-изопропил-1-(3-метилбут-2-енилоксиметил)урацилу **29** (рис. 7), который ингибировал репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 в концентрации менее 1 нМ и имел индекс селективности более 667 000. Однако, как и все представители ряда НЕРТ, соединение имело низкий генетический барьер. В результате мутации аминокислотных остатков, выстилающих гидрофобный карман (Y181C, K103N или Y181C + K103N), ингибиторная активность соединения **29** падала более чем в 3500 раз[63].

Введение фенильного заместителя в состав боковой цепи соединения **29** также дало высокоактивное соединение, хотя и уступающее в защитном эффекте. 1-((E)-Циннамилоксиметил)-6-(3,5-диметилбензил)-5-этилурацил **30** (рис. 7) в концентрации 0,003 мкМ защищал от цитопатического эффекта ВИЧ-1 в культуре МТ-4 клеток на 50% и имел индекс селективности 10667[64]. Сходные свойства продемонстрировали производные урацила с (2-феноксиэтил)оксиметил заместителями в положении N¹ и 3,5-диметоксибензильным фрагментом в 6 положении[65].

Модификации мостика, связывающего арильный фрагмент с остатком урацила, в частности введение в положение 6 урацила 1-арилвинильного фрагмента, не привели к усилению ингибиторной активности. Наиболее эффективным ингибитором в данной группе был 6-[1-(3,5-диметилфенил)винил]-1-этоксиметил-5-этилурацил **31** (рис. 8) с EC₅₀ 0,035 мкМ в клетках МТ-4 инфицированных ВИЧ-1 и индексом селективности > 2857. При этом было показано, что соединение **31** малоактивно в отношении мутантных штаммов ВИЧ-1 Y181C и Y181C+K103N с ИК₅₀ 17 и 29 мкМ, соответственно[66].

Локша и соавторы[67] описали синтез и анти-ВИЧ-1 свойства производных 6-бензил-5-этилурацила, содержащих атом фтора в метиленовом фрагменте. Было обнаружено, что 3-[(3-(этоксиметил)-5-этил-1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксопиримидин-4-

ил)фторметил]бензонитрил **32** (рис. 8) проявляет ингибиторные свойства в отношении дикого штамма ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 (EC_{50} 0,07 мкМ). Однако его активность в отношении мутантных штаммов ВИЧ-1 Y181C и Y181C+K103N была ниже на 2-3 порядка. Высокий генетический барьер продемонстрировал 6-[дифтор(3-метил-5-цианофенил)метил]-1-этил-5-изопропилаурацил **33** (рис. 5), который в культуре МТ-2 клеток блокировал репликацию ВИЧ-1 как дикого штамма, так и его мутантных вариантов (Y181C и K103N+Y181C) в наномолярных концентрациях: EC_{50} 4.2, 4.3 и 9.0 нМ, соответственно[68].

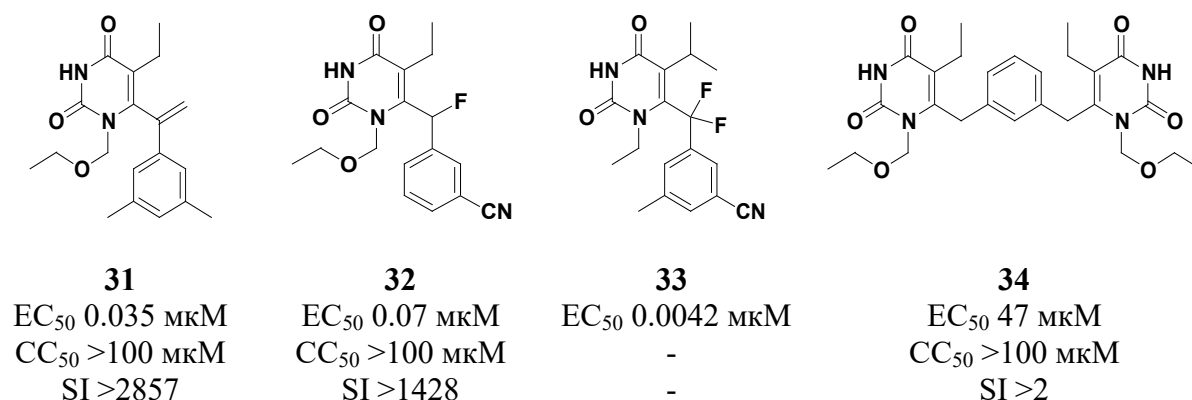


Рисунок 8. Структуры и соединений **31-34**

Необходимо упомянуть о димерных аналогах соединения **26** (МКС-442), содержащих в своей структуре два остатка 5-этилурацила, которые связаны по положению 6 с ароматическим фрагментом. Представителем соединений этого ряда, синтезированного Али и др.[69], является 5-этил-1-этоксиметил-6-[3-[(5-этил-1-этоксиметил-2,6-диоксопиримидин-4-(1H,3H)-ил)метил]-бензил]пиримидин-2,4(1H,3H)-дион **34** (рис. 8). При изучении анти-ВИЧ-1 свойств в культуре МТ-4 клеток была обнаружена слабая активность в отношении дикого штамма ВИЧ-1 и отсутствие активности в отношении мутантных штаммов (Y181C и K103N+Y181C)[69].

Введение 1-нафтоильного заместителя в положении 6 остатка урацила привело к существенному уменьшению противовирусной активности[70, 71]. Также неактивными оказались аналоги НЕРТ с 6-алкенильным или 6-циклогексенильным заместителями[72].

Описаны многочисленные 1-замещенные 6-ариламино- и 6-арилокси-производные урацила. Однако их анти-ВИЧ-1 активность уступала вышеописанным соединениям[57, 73, 74]. Из серии 1-замещенных 6-[(2,4-дихлорфенокси)метил]-производных урацила наибольшую анти-ВИЧ-1 активность проявил 1-(бензилоксиметил)-6-(2,4-дихлорфеноксиметил)-5-иодурацил **35** (рис. 9), который подавлял репликацию вируса в культуре СЕМ/0 клеток в концентрации EC_{50} 0.16 мкМ, на порядок лучше чем НЕРТ[75].

Его гомологи – 6-бензилоксиметил-производные урацила – соединения **36** и **37** (рис. 9) оказались активны как в отношении ВИЧ-1 (**36**: EC_{50} 0.31 мкМ, IC_{50} (ОТ ВИЧ) 0.74 мкМ; **37**: EC_{50} 7.0 мкМ) в культуре МТ-4 клеток, так и в отношении вируса гриппа H1N1 (**36**: EC_{50} 32 мкМ; **37**: EC_{50} 0.3 мкМ) в культуре MDCK клеток[76].

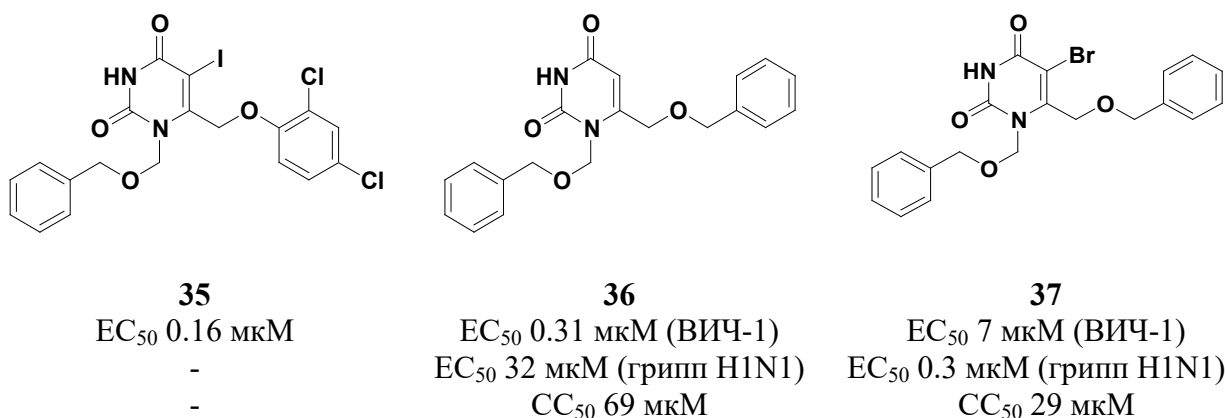


Рисунок 9. Структуры и свойства соединений **35-37**

1.2.2.2. Особенности химического синтеза 6-бензил-производных НЕРТ

Синтез соединения **29**, представленный на схеме 6, заключался в конденсации 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидина **38** с ацеталем – бис-(3-метилбут-2-енилокси)метан[77] в растворе ацетонитрила в присутствии триметилсилилтрифлата, что вело к целевому 6-(3,5-диметилбензил)-5-изопропил-1-(3-метилбут-2-енилоксиметил)урацилу, выход которого составил 29%[63]. В аналогичных условиях были получены соединения **35 – 37**[57, 76].

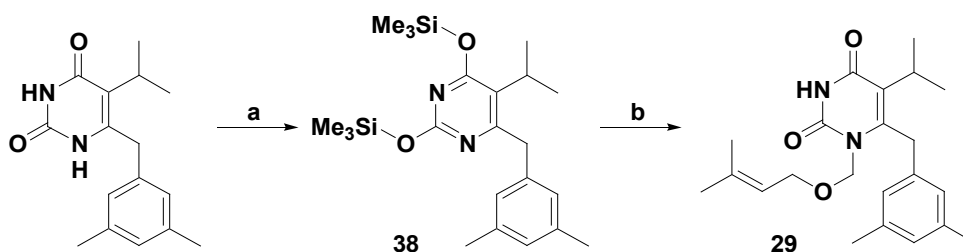


Схема 6. Условия и реагенты: а) HMDS, $(NH_4)_2SO_4$, кипячение в течение ночи; б) ацетонитрил, бис-(3-метилбут-2-енилокси)метан, TMS трифлат, $-40^{\circ}C$, 72%.

Описан также метод введения бензильного фрагмента непосредственно в 6-е положение остатка урацила. Исходный 1-замещенный 5-алкилурацил **39** обрабатывают избытком 2,2,6,6-тетраметилпиперидида лития[78] или LDA[62] и образовавшуюся Li-соль конденсируют с бензальдегидом, что ведет к 6-фенилгидроксиметил-производному **40**. Соединение **40** последовательно ацетилируют уксусным ангидридом и подвергают гидрогенолизу в растворе этанола в присутствии Pd/C (схема 7) с получением продукта **28** или его аналогов с различными заместителями R₁ и R₂.

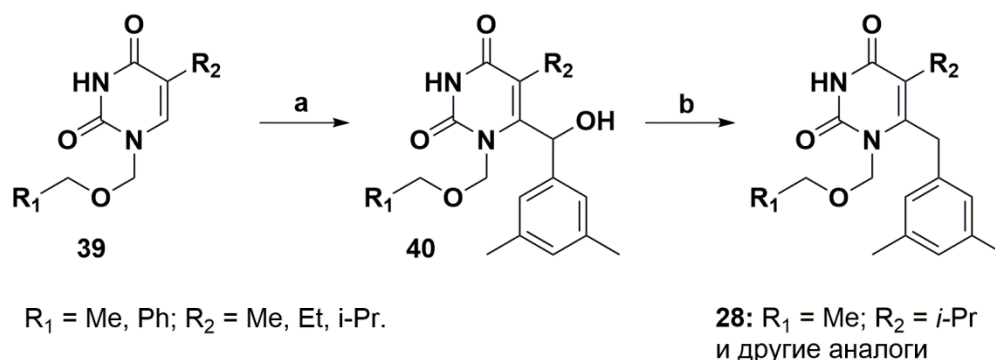


Схема 7. Условия и реагенты: а) LDA, 3,5-диметилбензальдегид, ТГФ, -70°C, 1 ч;
б) (i) Ac₂O, Py, rt, ночь; (ii) H₂, Pd/C, EtOH, 24 ч, rt.

Еще один метод введения бензильного фрагмента в пиримидиновый цикл основан на использовании реактивов Гриньяра (схема 8). Соединение **41** обрабатывали изопропилмагнийхлоридом в ТГФ в присутствии LiCl, а затем добавляли бензилбромид и получали 6-бензил-производное **42**. Его гидролиз привёл к 6-бензил-5-изопропилаурацилу **43**, алкилированием которого может быть получено соединение **26** (МКС-442)[79].

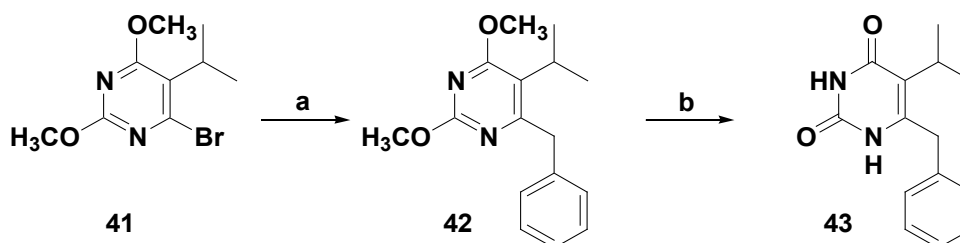


Схема 8. Условия и реагенты: а) (i) *i*-PrMgCl·LiCl, ТГФ, rt, 5ч; (ii) PhCH₂Br, 20 ч, 87%;
б) HCl, MeOH, Δ, 5 ч, 92%.

Альтернативным методом синтеза 1-замещённых производных 6-бензилурацилов является использование в качестве исходных соединений эфиров 4-арил-3-оксомасляных

кислот **44**, которые конденсируют с тиомочевинной в присутствии алкоголятов щелочных металлов, что приводит к образованию 2-тиоурацилов **45** с хорошими выходами (схема 9). Их обработка 10% водным раствором 2-хлоруксусной кислоты даёт 6-бензилурацилы **46**, из которых синтезируют соединения **26 – 30**[80, 81].

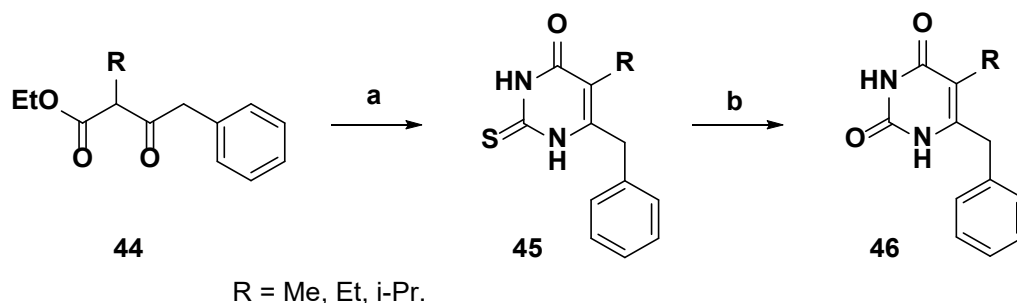


Схема 9. Условия и реагенты: а) тиомочевина, NaOEt, EtOH, Δ; б) 10%-водная ClCH₂COOH, Δ.

1.2.3. 6-Бензоил содержащие аналоги урацила

1.2.3.1. Эволюция структуры

Замена атома серы в НЕРТ (**1**) на карбонильную группу, связывающую пиримидин с 3,5-диметилфенильным фрагментом, позволила Сон и соавторам[73] получить целый ряд высокоактивных 6-(3,5-диметилбензоил)-5-этил- и 5-изопропилурацилов, содержащих в положении 1 алкенильный или алкинильный заместитель (рис. 10). Наибольший интерес представляет 1-(4-ацетокси-*транс*-2-бутенил)-5-изопропил-6-(3,5-диметилбензоил)урацил **47**, который ингибировал репликацию ВИЧ-1 в концентрации менее 9 нМ и имел индекс селективности более 6487.

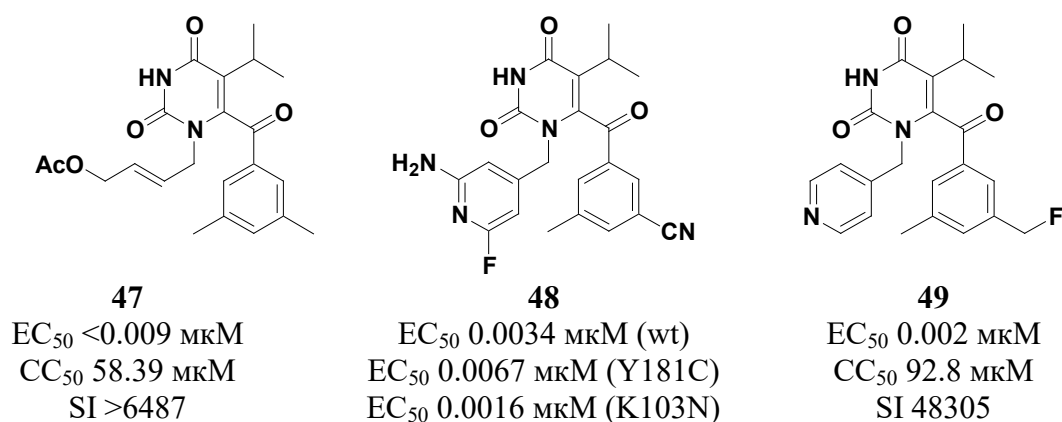
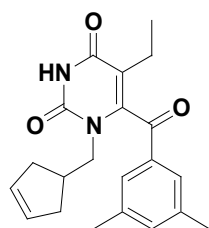


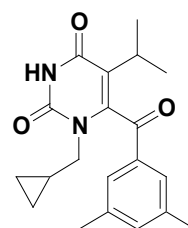
Рисунок 10. Структуры и свойства соединений **47-49**

Введение пиридилметильных заместителей в положение 1 остатка 6-бензоилурацила привело к ряду соединений, демонстрирующих существенно более высокий генетический барьер. Так 1-[(2-амино-6-фторпиридин-4-ил)метил]-5-изопропил-6-(3-метил-5-цианобензоил)пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион **48** в культуре МТ-2 клеток показал близкие ингибиторные свойства в отношении ВИЧ-1 дикого типа и мутантных штаммов, несущих мутации Y181C или K103N[82]. Замена цианогруппы на фторметильную дала высокоактивное соединение - 6-[3-(фторметил)-5-метилбензоил]-5-изопропил-1-(пиридин-4-илметил)урацил **49**, подавлявшее репликацию ВИЧ-1 с EC_{50} 2 нМ и имевшее индекс селективности более 48 000[74].



50 (IQP-0410)

EC_{50} 0.2 нМ (ВИЧ-1), SI 2777778
 EC_{50} = 16 мкМ (ВИЧ-2), SI > 71
 EC_{50} = 0.18 мкМ (проникновение ВИЧ-1)
 SI = 15714; IC_{50} = 0,07 мкМ (ОТ)



51 (IQP-0528)

EC_{50} = 0.2 нМ (ВИЧ-1), SI > 2000000
 EC_{50} = 0.1 мкМ (ВИЧ-2), SI > 13030
 EC_{50} = 12 нМ (проникновение ВИЧ-1)
 SI = 100778; IC_{50} = 1,97 мкМ (ОТ)

Рисунок 11. Структуры и свойства соединений **50-51**

Группой Букхейта было предпринято исследование зависимости активности 6-(3,5-диметилбензоил)-5-алкилурацилов от структуры заместителей в 1-м положении гетероциклического основания, в частности циклопропилметильного, циклобутилметильного, циклогексилметильного, бензильного, 1-циклопентен-1-илметильного и 3-циклопентен-1-илметильного[83-85]. Наилучшие противовирусные свойства показали 1-(циклопент-3-ен-1-илметил)-6-(3,5-диметилбензоил)-5-этилурацил **50** и 1-(циклопропилметил)-6-(3,5-диметилбензоил)-5-изопропилурацил **51** (рис. 11). Изучение противовирусной эффективности **50** и **51** в отношении лабораторных и клинических изолятов ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вируса иммунодефицита обезьян (SIV) было проведено в различных клеточных линиях: Т-клетках (СЕМ-SS, Н9 и МТ2), В-клетках (АА5), моноцитах (U937) и гибридной линии Т/В-клеток (174×СЕМ). Было установлено, что соединения проявляют высокую ингибиторную активность в отношении ВИЧ-1 во всех клеточных линиях с EC_{50} от 0,0009 до 0,01 мкМ, не проявляя токсического действия во всех клеточных линиях до концентрации 1000 мкМ, выше которой наблюдалось

выпадение веществ в осадок. Индексы селективности **50** и **51** в СЕМ-SS-клетках, инфицированных ПВ-штаммом ВИЧ-1 превышали 2 миллиона. При изучении противовирусной эффективности соединений **50** и **51** в отношении ROD-штамма ВИЧ-2 также обнаружено ингибиторное действие, хотя в 50-200 раз менее выраженное, чем в случае ингибирования репликации ВИЧ-1, индекс селективности соединений **50** и **51** был >71 и >13030 , соответственно. Изучение механизма действия показало, что соединения **50** и **51** ингибируют ОТ ВИЧ-1 гомополимерных матрицы-праймера (поли(rC)-олиго(dG)), так и в случае гетерополимерной системы с рРНК, но неактивны в отношении ОТ ВИЧ-2. Дополнительное изучение механизма действия выявило, что соединения **50** и **51** не ингибируют активность интегразы, протеазы, РНазы Н в концентрации до 100 мкМ. Исследования в HeLa-LTR-клетках, инфицированных ВИЧ-1 или ВИЧ-2, показали, что данные соединения эффективно блокируют прикрепление вируса к клетке, причем, ингибиторные концентрации прикрепления вируса близки к ингибиторным концентрациям, полученным для ВИЧ-2 в клеточной культуре. Ингибирование проникновения вирусов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в клетки происходит за счет распознавания сложного сайта связывания, образованного при взаимодействии вируса с клетками-мишенями, но не включает прямого ингибирования связывания gp120-CD₄. Для дальнейшего изучения способов действия соединения **50** в культуре клеток были отобраны и охарактеризованы устойчивые штаммы ВИЧ-1 и ВИЧ-2. В случае ВИЧ-1 зафиксировано три фазы появления устойчивости: возникновение отдельных аминокислотных изменений в связывающем кармане ННИОТ; изменения в гликопротеинах оболочки gp120 и gp41; последующие множественные дополнительные изменения в ОТ. В случае ВИЧ-2 устойчивость к ингибированию проникновения была достигнута без изменений в ОТ, несколько мутаций были идентифицированы в гликопротеинах оболочки, что подтверждает механизм ингибирования проникновения соединения **50** в отношении ВИЧ-2[86]. Соединение **50** было исследовано против штаммов ВИЧ-1, резистентных к действию ННИОТ. Вирусы с аминокислотными мутациями L100I, T139I и M184V оставались полностью чувствительными к действию соединения **50**. Понижение эффективности в 18 раз наблюдалось при тестировании вещества **50** в отношении вирусов с мутациями K101E и V108I. Более высокий уровень резистентности был обнаружен в отношении вирусов с мутациями A98G + V108I (70 раз), P236L (33 раз), Y188H (55 раз), K103N (> 50 раз) и Y181C (от 10 до 375 раз). Соединение **50** имеет лучший профиль резистентности, чем невирапин[87]. Двойной механизм действия (ингибирование ОТ и блокирование слияния вируса с клеткой), высокая эффективность, минимальная токсичность для вагинальных клеток и естественной флоры, а также

широкий спектр активности против клинических вирусов дикого типа и лекарственно-устойчивых вирусов, делают эти молекулы привлекательными кандидатами для разработки микробицидов[88]. В отсутствие эффективной вакцины против ВИЧ открытие кандидатов-микробицидов для предотвращения передачи ВИЧ-инфекции половым путем считается важным подходом к предотвращению дальнейшего распространения вируса. По этой причине для соединения **51** была оценена возможность применения в форме вагинального геля[89, 90] и полимерных пленок[91, 92]. Компания ImQuest BioSciences в 2019 проводила клинические испытания микробицидного геля, содержащего соединение **51** (IQP-0528)[93].

1.2.3.2. Особенности химического синтеза 6-бензоил содержащих аналогов урацила

Синтез 6-бензоилпроизводных урацила **53**, представленный на схеме 10, заключался в конденсации 6-хлорпиримидина **52** с фенилацетонитрилом в растворе ДМФА в присутствии NaN. При этом образовывались соответствующие 6-(α -цианобензил)-производные пиримидина, которые без выделения из реакционной смеси подвергали окислению чистым кислородом в течение 1 ч. Последующий кислотный гидролиз дал соответствующие 6-бензоилурацилы[94, 95].

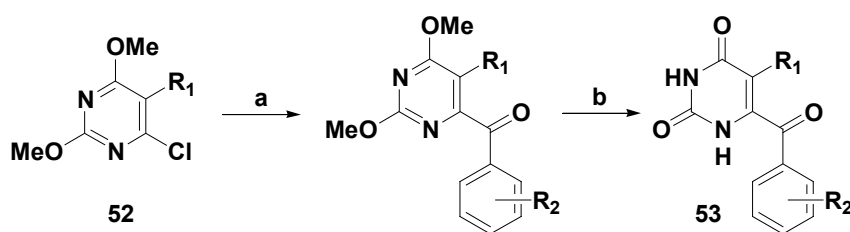


Схема 10. Условия и реагенты: а) (i) ArCH₂CN, NaN, ДМФА; (ii) O₂, 1 ч; б) HCl, MeOH.

Другой метод, не предполагающий окисления, предложен в работе Бардаги и Росси[96]. Он основан на реакции Стилле с использованием в качестве исходного соединения 2,4-диметокси-6-(триметилстаннил)пиримидина **54**, который получали обработкой 2,4-диметокси-6-хлорпиримидина триметилстаннил натрием. Выход соединения **54** составил 76%. Последующее его сочетание с ароилхлоридом в присутствии Pd(PPh₃)₂Cl₂ в толуоле и дальнейший гидролиз привели к 6-бензоилурацилу **55** с выходом 54% (см. схему 11).

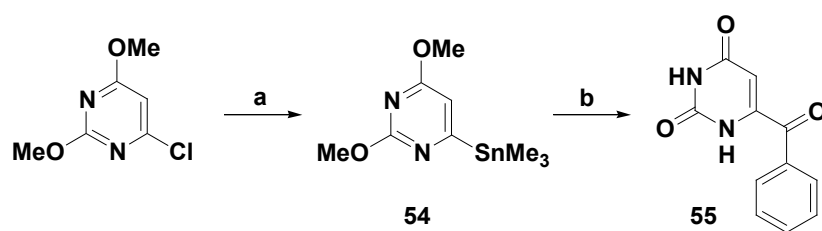


Схема 11. Условия и реагенты: а) NaSnMe_3 ; б) (i) PhCOCl , толуол, $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$; (ii) HCl , MeOH .

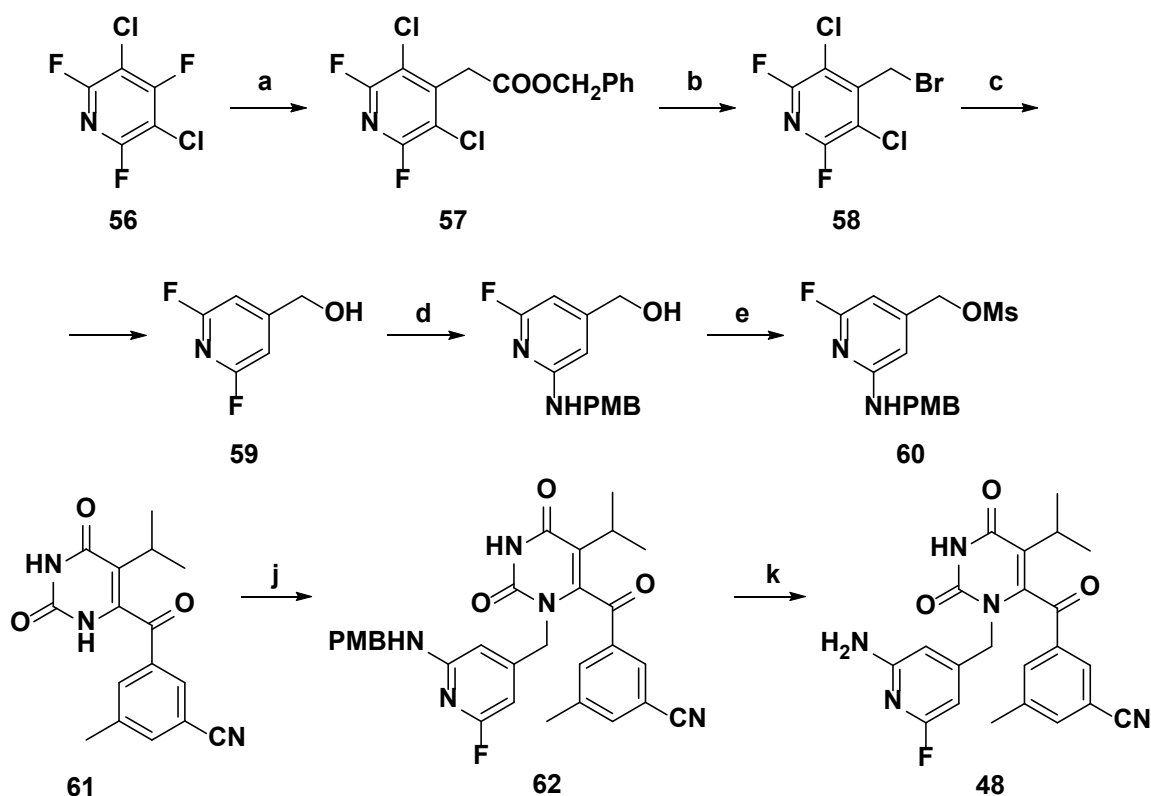


Схема 12. Условия и реагенты: а) (i) дибензилмалонат, NaNH , ДМФА; (ii) $\text{DMCO/H}_2\text{O}$, 130°C , 75%; б) (i) H_2 , Pd/C , ТГФ, 78–89%; (ii) HgO , Br_2 , хлорбензол, 145°C , 75–80%; в) (i) NaOBz , ДМФА, 66–81%; (ii) H_2 (50 psi), Pd/C , EtOH , 61%; (iii) NaOMe , MeOH , 95–98%; г) 4-метоксибензиламин, 125°C , 90–94%; д) метансульфонилхлорид, Et_3N , CHCl_3 ; ж) **60**, K_2CO_3 , LiI , ДМФА, 32–55%; з) $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, $\text{MeCN/H}_2\text{O}$, 77%.

Соединение **48** синтезировали, исходя из 3,5-дихлор-2,4,6-трифторпиридина **56**, который конденсировали с дибензилмалонатом и подвергали моно-декарбоксилированию. Гидрогенолиз бензильного эфира **57** давал соответствующую кислоту, а декарбоксилирование с сопутствующим бромированием приводило к бромиду **58**. Обработка бромида **58** бензоатом натрия, удаление атомов хлора гидрогенолизом и бензоильной группы переэтерификацией давали 2,6-дифтор-4-гидроксиметилпиридин **59**. Замещение фторида *p*-метоксибензиламином, метилирование гидроксильной группы

приводило к образованию мезилата **60**, реакция которого с 6-(3-циано-5-метилбензоил)-5-изопропилаурацилом **61** обеспечивала производное урацила **62**. Последующее снятие защиты давало целевое соединение **48** (схема 12)[68,82].

1.3. *N*¹-замещенные производные урацила

1.3.1. Эволюция структуры

В 2009 г группа Андерсон описала анти-ВИЧ-1 свойства 1-[2-(2-бензил-4-метилфенокси)этил]урацила (**63**). Само соединение показало умеренные ингибиторные свойства, но на его основе в дальнейшем были созданы высокоактивные анти-ВИЧ-1 агенты[97]. Усилению активности способствовало введение атомов хлора в состав дифенилметильного фрагмента. Так, у 1-(2-(4-хлор-2-(2,5-дихлорбензил)фенокси)этил)урацила **64** (рис. 12) активность в культуре клеток MT-2 выросла на порядок: его EC₅₀ 0.38 мкМ. Однако наличие галогенов в составе молекулы вело к усилению токсичности (CC₅₀ 15 мкМ).

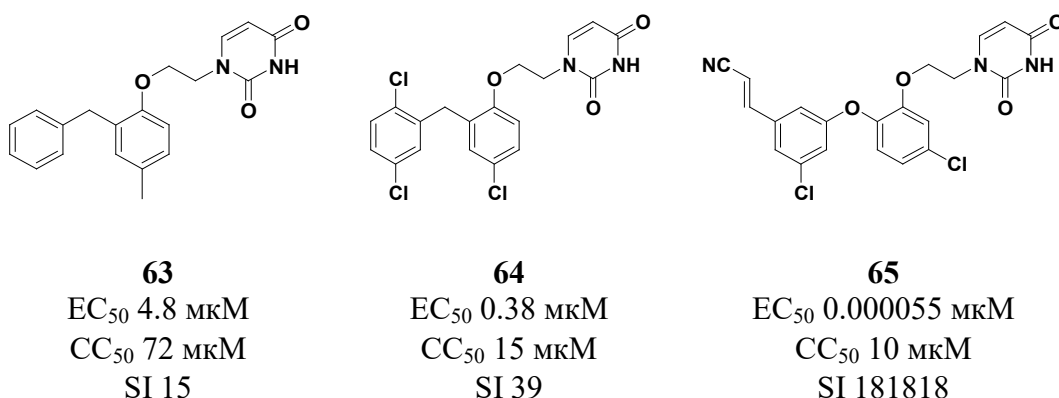


Рисунок 12. Структуры и свойства соединений **63-65**

Резкое усиление ингибиторных свойств наблюдалось при замене СН₂-группы на атом кислорода и одного из атомов хлора на CN-группу. В частности, производное **65** (рис. 12) блокировало репликацию ВИЧ-1 в экстремально низкой концентрации – EC₅₀ 0.055 нМ. Несмотря на то, что соединение **65** было достаточно токсичным (CC₅₀ 10 мкМ), его индекс селективности составил 181818. Показано, что мутации Y181C и K103N/Y181C в составе гидрофобного кармана ОТ ведут к падению активности соединений **64** и **65** на несколько порядков[98].

Синтезированы и исследованы бензофенон-урацил-производные[17], являющиеся аналогами бензофеноновых ННИОТ, описанных GlaxoSmithKline[99]. Наиболее активным

среди них оказался 1-[2-[4-хлор-2-(3,5-диметилбензоил)фенокси]этил]урацил (**66**), который ингибировал ВИЧ-1 в культуре клеток СЕМ с EC_{50} 0.016 мкМ и его индекс селективности превысил 19500 (рис. 13). Соединение показало заметную активность в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа – K_i 2.4 мкМ, сохраняло активность против большинства мутантных форм ОТ ВИЧ-1 (L100I, K103N, V106I, Y181C, Y188L, G190A и K103N / Y181C), но теряло активность в отношении штамма V106A и двойного мутанта K103N/Y181C[17]. Хотя абсолютные значения K_i были ближе к таковым для невирапина, профиль чувствительности **66** к большинству мутантных форм ОТ ВИЧ-1 близок к таковому для эфавиренца[17].

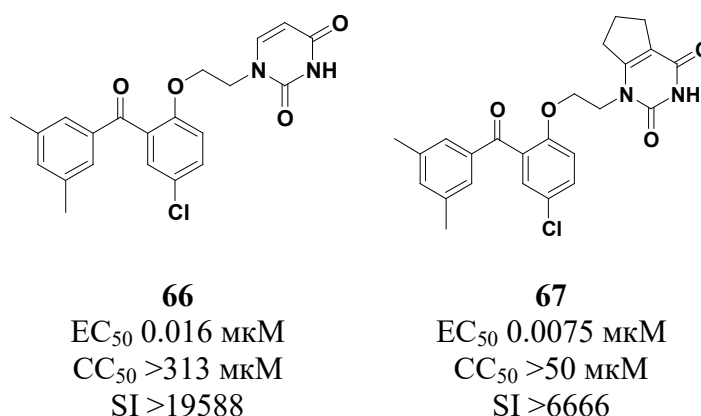


Рисунок 13. Структуры и свойства соединений **66-67**

Следующим этапом эволюции бензофенон-урацил-производных явился синтез и изучение анти-ВИЧ-1 свойств 1-[2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-6,7-дигидро-1Н-циклопента[d]пиримидин-2,4(3*H*,5*H*)-дион **67** (рис. 13), который в культуре клеток MAGI-CCR5 ингибировал репликацию вируса с EC_{50} 7.5 нМ и индексом селективности превышающим 6666[100].

Введение в молекулу ННИОТ цианвинильного фрагмента ведет, как правило, к усилению анти-ВИЧ-1 эффекта. Это хорошо видно на примере рилпивирина[101] или соединения **65**[98]. Однако вместе с этим заметно возрастает и цитотоксичность соединений. Это связано с тем, что цианвинильный фрагмент, попадая в клетку легко подвергается окислению и может давать токсичные метаболиты. По этой причине были разработаны соединения, в которых цианвинильный фрагмент был вписан во второй цикл бициклического фрагмента ННИОТ. Так, путем перебора ряда гетероциклических систем был синтезирован 8-(2-(2-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)этокси)фенокси)индолизин-2-карбонитрил **68** (рис. 14), EC_{50} которого составляла 0.38 нМ, что несколько хуже, чем EC_{50} соединения **65**. Однако за счет существенного снижения цитотоксичности соединения **68** его индекс селективности превысил 263157[102]. Недостатком соединения

68 явилось падение активности в отношении мутанта Y181C и двойного мутанта K103N/Y181C на три порядка[102].

По этой причине были предприняты попытки поиска родственных соединений с более высоким генетическим барьером. Таким соединением оказался 5-(2-(2-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)этокси)-4-фторфенокси)-7-фтор-2-нафтонитрил **69** (рис. 14), который в культуре клеток МТ-2 блокировал репликацию ВИЧ-1 с EC_{50} 1.9 нМ (wt), 5.6 нМ (Y181C) и 21 нМ (K103N/Y181C)[103].

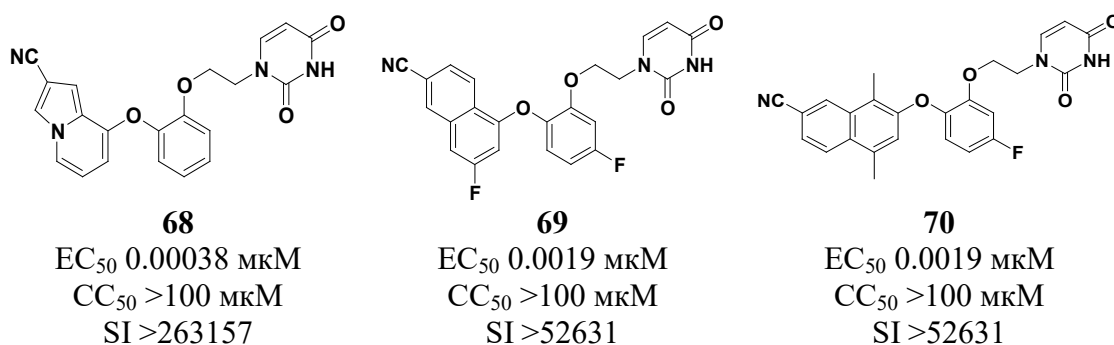


Рисунок 14. Структуры и свойства соединений **68-70**

Замена 1-нафтильного фрагмента в соединении **69** на 2-нафтильный привела к серии ингибиторов, среди которых наибольшую активность показал 7-(2-(2-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)этокси)-4-фторфенокси)-5,8-диметил-2-нафтонитрил **70** (рис. 14), блокировавший репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-2 в концентрации EC_{50} 1.9 нМ (wt), 28 нМ (Y181C) и 410 нМ (K103N/Y181C)[104]. Сравнение генетического барьера показало, что **70** заметно уступает **69**[105].

Доклинические исследования соединений **65** и **69** проводили на мышах линии BALB/c[105]. Однократное внутрибрюшинное введение каждого из соединений приводило к увеличению времени пребывания в сыворотке до 48 часов и максимуму концентрации (C_{max}) в 4000-15000 раз выше, чем их терапевтические / эффективные концентрации. Эти значения C_{max} были в 4-15 раз ниже, чем их цитотоксические концентрации, наблюдаемые в клетках МТ-2. Соединение **69** показало биодоступность и снижение клиренса в плазме по сравнению с **65** и эфавиренцем (стандарт ННИОТ). Оба соединения хорошо, без признаков острой токсичности, переносились мышами BALB. Таким образом, соединения **65** и **69**, наряду с высокой анти-ВИЧ-1 активностью *in vitro* продемонстрировали безопасность и увеличенное время циркуляции *in vivo*, что сделало их перспективными для дальнейшей разработки в качестве новых ННИОТ ВИЧ[105]. Последующее изучение соединения **69** выявило синергизм противовирусной активности с существующими анти-ВИЧ препаратами

(эмтрицитабин, тенофовир дизопроксил фумарат, элвитегравир, фестинавир). Была также показана его эффективность на гуманизированных мышах (Hu-PBL). Соединение полностью подавляло вирусную нагрузку и предотвращая потерю CD4⁺ Т-клеток человека. Разработаны наночастицы соединения **69** длительного действия в лактид-когликолидном полимере, показавшие устойчивое поддержание концентрации соединения после однократного введения[106].

Описан другой класс ННИОТ, имеющий в своем составе диарильный эфир. 5-Замещенные урацилы, несущие при атоме азота N¹ 3-феноксипбензильный заместитель, проявили существенную активность как в отношении изолированной ОТ ВИЧ-1, так и на культуре инфицированных клеток МТ-4. Наиболее перспективным оказалось соединение **71** (рис. 15), которое ингибировало активность фермента дикого типа и двойного мутанта K103N/Y181C с IC₅₀ 3 нМ. В клеточной культуре **71** блокировало репликацию ВИЧ-1 с EC₅₀ 1 нМ (wt) и 11 нМ (K103N/Y181C). Соединение **71** в наномолярных концентрациях было эффективно в отношении целого ряда вариантов ОТ, содержащих наиболее клинически значимые мутации[107].

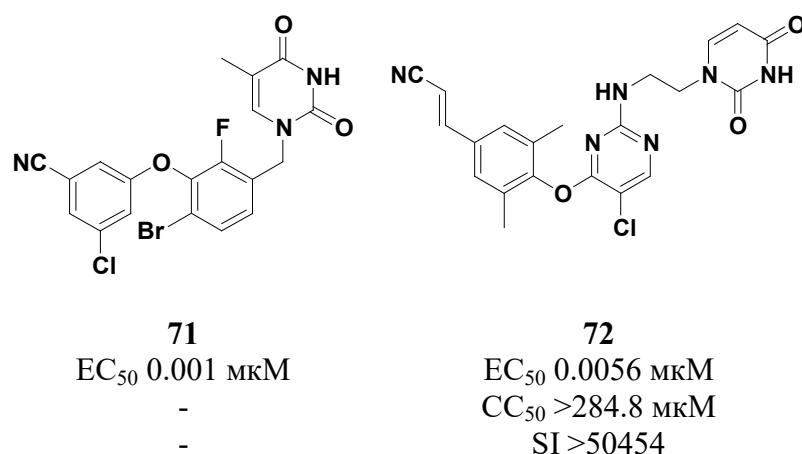


Рисунок 15. Структуры и свойства соединений **71-72**

Еще одной группой соединений явились химерные структуры, содержащие в своем составе диарильный фрагмент этравирина/рилпивирина и 1-этилурацильный фрагмент, входящий в состав соединений **63 – 69**. Наиболее активным соединением явился (*E*)-3-(4-((5-хлор-2-((2-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)этил)амино)пиримидин-4-ил)окси)-3,5-диметилфенил)акрилонитрил **72** (рис. 15), который ингибировал ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 с EC₅₀ 0.0056 мкМ и имел индекс селективности превышающий 50454. Соединение подавляло активность ОТ ВИЧ-1 с IC₅₀ 1.58 мкМ что сравнимо с действием невирапина и этравирина. Однако изучение его генетического барьера

показало, что **72** заметно теряет анти-ВИЧ-1 эффект в случае мутантов K103N, L100I, Y181C, E138K и Y188L и практически полностью неактивен при двойных мутациях (Y181C/K103N, F227L/V106A)[108].

1.3.2. Синтез N^1 -замещенных производных урацила

Синтез производных урацила **63** – **70** можно свести к трем основным этапам:

- А) формирование диарильной части;
- В) синтез 2-бромэтильного интермедиата;
- С) получение целевого соединения путем взаимодействия 2-бромэтилового интермедиата с соответствующим нуклеофилом.

Синтез соединений **63**, **64**, **66** и **67** представлен на схеме 13.

А) 2-Бензил-4-метилфенол **73a** ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = 4\text{-Me}$, $X = \text{CH}_2$) и 4-хлор-2-(2,5-дихлорбензил)фенол **73b** ($R_1 = 2,5\text{-Cl}_2$, $R_2 = 4\text{-Cl}$, $X = \text{CH}_2$), входящие в состав 1-[2-(2-бензилфенокси)этил]урацилов **63** и **64**, получали по реакции Фриделя-Крафтса из бензилгалогенидов или бензиловых спиртов с фенолами в присутствии кислот Льюиса (ZnCl_2 , AlCl_3)[109] или реакцией бензилгалогенидов с фенолятами калия в среде безводного неполярного растворителя (бензол, толуол)[110]. 4-Хлор-2-(3,5-диметилбензоил)фенол **73c** ($R_1 = 3,5\text{-Me}_2$, $R_2 = 4\text{-Cl}$, $X = \text{C(O)}$), который входит в состав 1-[2-[4-хлор-2-(3,5-диметилбензоил)фенокси]этил]-производных урацила **66** и **67**, был получен в условиях перегруппировки Фриса.

В) 2-Бромэтиловые эфиры **74** соответствующих фенолов были получены двумя способами: (1) по реакции Мицунобу (DIAD , Ph_3P , 2-R-фенол и 2-бромэтанол)[98] или (2) обработкой фенола **73** 4-х кратным молярным избытком 1,2-дибромэтана в растворе ацетона в присутствии K_2CO_3 [111].

С) Синтез целевых урацилов **63**, **64**, **66** и **67** был осуществлен путем конденсации эквимольных количеств 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидинов и бромидов без растворителя при нагревании до 170-180°C в течение 1.5 ч.[112].

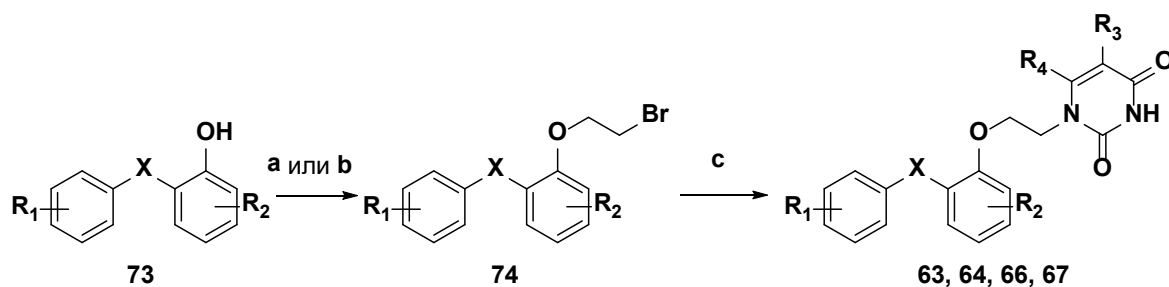


Схема 13. Условия и реагенты: а) DIAD , 2-бромэтанол, Ph_3P , ТГФ, rt, ночь; б) 1,2-дибромэтан, ацетон, Δ , 48 ч; 68-92%; в) 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидин, 170-180°C, 1.5 ч; 38-90%.

Соединение **65** содержит цианвинильный фрагмент. По этой причине синтез **65**, представленный на схеме 14, несколько отличается от синтеза соединений **63**, **64**, **66** и **67**. Не смотря на заметные структурные различия между указанными соединениями, их синтез также состоит из трех ранее упомянутых этапов – А – С.

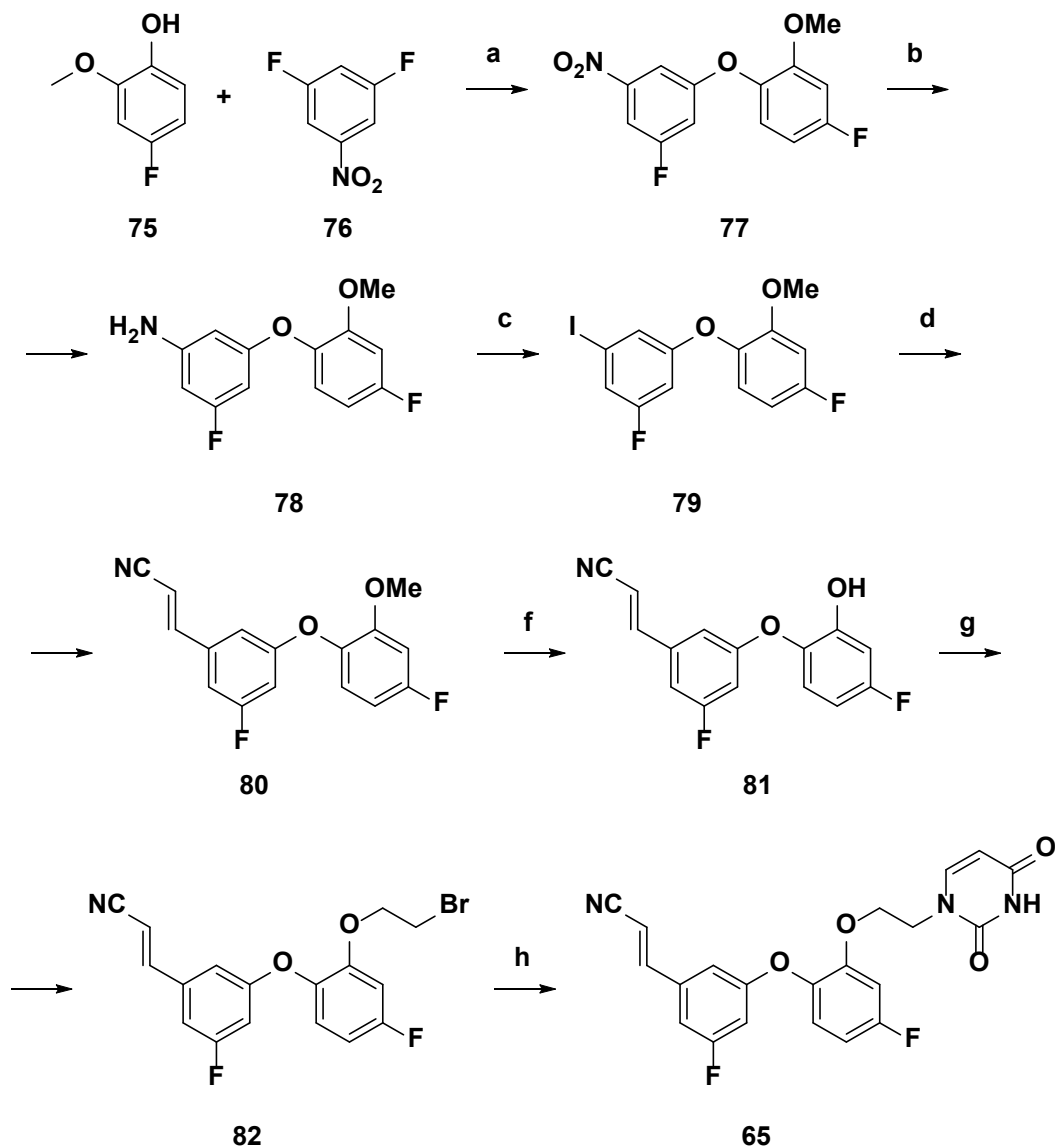


Схема 14. Условия и реагенты: (a) K_2CO_3 , ДМСО, $60^\circ C$, ночь; (b) Fe, NH_4Cl , EtOH, H_2O , $75^\circ C$, 2 ч; (c) $NaNO_2$, конц. HCl, KI, $0^\circ C$, 2 ч; (d) акрилонитрил, $PdCl_2(PPh_3)_2$, Et_3N , ДМФА, $140^\circ C$, 2 ч; (f) LiCl, ДМФА $160^\circ C$, 16 ч; (g) DIAD, 2-бромэтанол, Ph_3P , ТГФ, rt, ночь; (h) 3-бензоилурацил, K_2CO_3 , ДМФА, rt, ночь, затем NH_4OH , MeOH, rt; 23%.

Этап А включает в себя несколько стадий и начинается с конденсации 4-фтор-2-метоксифенола **75** и 3,5-дифтор-1-нитробензола **76** в условиях реакции S_NAr . Образующийся при этом замещенный фениловый эфир **77**, содержащий в своем составе NO_2 -группу, восстанавливают в присутствии Fe и NH_4Cl до соответствующего амина **78**, который путем обработки нитритом натрия и KI в условиях реакции Зандмейера,

превращают в иодид **79**[98]. Цианвинильный заместитель вводят путем обработки иодида **79** акрилонитрилом в условиях реакции Хека в растворе ДМФА, в присутствии Et₃N и каталитического количества PdCl₂(PPh₃)₂, что ведет к образованию (*E*)-цианвинил-производного фенилового эфира **80**. Гидролиз метокси-группы в эфире **80**, который осуществляют действием хлорида лития в кипящем ДМФА, приводит к целевому (*E*)-цианвинил-производному **81**[98].

Этап В синтеза соединения **65** (схема 14) заключается во введении 2-бромэтилового заместителя по фенольному гидроксиду пирокатехина **81**. В условиях реакции Мицунобу (DIAD, Ph₃P, 2-*R*-фенол и 2-бромэтанол) образовывается бромид **82**, который используют на следующем этапе для синтеза целевого соединения **65**[98].

Этап С. Наличие в бромиде **82** (схема 14) ненасыщенного фрагмента делает данное соединение склонным к окислению, что не позволяет использовать конденсацию с 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидином, поскольку она протекает в жестких условиях (нагревание при 170-180°C). Для преодоления этой проблемы используют *N*-бензоилурацил, который алкилируют бромидом **82** с последующим гидролизом бензоильной группы в соответствии с ранее разработанным методом[113].

На схеме 15 показан синтез соединения **68**, отличающийся от ранее представленных. Тем не менее, и здесь также прослеживаются три этапа – А – С.

Этап А. Синтез индолизиновой системы, содержащей в положении 2 циано-группу осуществляют в соответствии с разработанным ранее методом[114]. Исходный 3-бромпиридин-2-карбальдегид **83** обрабатывают акрилонитрилом в присутствии DABCO что ведет к образованию 2-[(3-бромпиридин-2-ил)(гидрокси)метил]проп-2-еннитрила **84**, который при нагревании с уксусным ангидридом замыкается в 8-броминдолизин-2-карбонитрил **85**. Обработка нитрила **85** 2-метоксифенолом в присутствии карбоната цезия, каталитических количеств иодида меди I и 2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептандиона дает 8-(2-метоксифеноксид)индолизин-2-карбонитрил **86**. Гидролиз метокси-группы в 2-цианоиндолизиновом эфире гваякола **86** путем обработки VBr₃ приводит к образованию 8-(2-гидроксифеноксид)индолизин-2-карбонитрила **87**.

Этап В. 3-Бензоил-1-(2-бромэтил)урацил **88** получают путем алкилирования 3-бензоилурацила избытком 1,2-дибромэтана в растворе ДМФА в присутствии карбоната калия[102]. Выход интермедиата **88** составляет 37%.

Этап С. Синтез целевого соединения **68** осуществляют взаимодействием эфира пирокатехина **87** и 2-бромэтил-производного урацила **88** в растворе ДМФА в присутствии

карбоната калия с последующим гидролитическим отщеплением остатка бензойной кислоты.

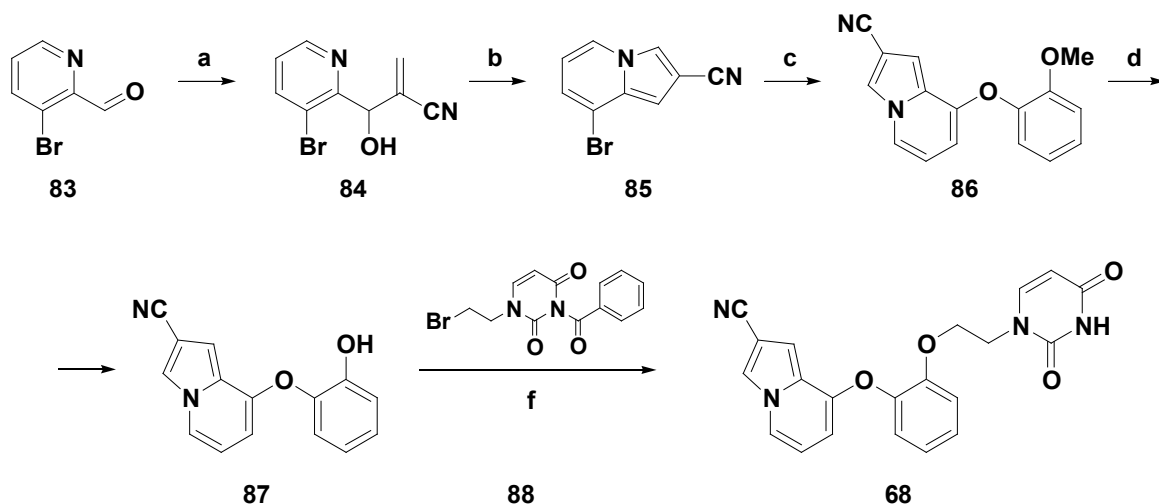


Схема 15. Условия и реагенты: (а) акрилонитрил, DABCO, 2 ч; (b) As_2O_3 , 100°C , 2 ч $\rightarrow 140^\circ\text{C}$, 16 ч; (с) CuI , Cs_2CO_3 , 2-метоксифенол, 2,2,6,6-тетрамethyl-3,5-гептандион, диоксан, 120°C , 18 ч; (d) VBr_3 , CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 3 ч; (f) K_2CO_3 , ДМФА, 60°C , 3 ч затем NH_4OH , CH_2Cl_2 , 16 ч, 29%.

В синтезе соединения **69** (схема 16) также выделяют три этапа.

Этап А заключается в синтезе 7-фтор-5-(4-фтор-2-метоксифенокси)-2-нафтонитрила **89** путем взаимодействия 4-фтор-2-метоксифенола **90** и 5-бром-7-фтор-2-нафтонитрила **91**, путь получения которого в присутствии карбоната цезия и каталитических количеств CuI и 2,2,6,6-тетрамethyl-3,5-гептандиона был описан ранее[115, 116]. Гидролиз метокси-группы в соединении **89** осуществляют обработкой VBr_3 , что дает 7-фтор-5-(4-фтор-2-гидроксифенокси)-2-нафтонитрил **92**.

Этап В. 3-Бензоил-1-(2-бромэтил)урацил **88** получают как описано выше[102].

Этап С. Синтез целевого соединения **69** осуществляют взаимодействием эфира 4-фторпирокатехина **92** и 3-бензоил-1-(2-бромэтил)урацила **88** в растворе ДМФА и в присутствии карбоната калия с последующим гидролитическим отщеплением остатка бензойной кислоты[103].

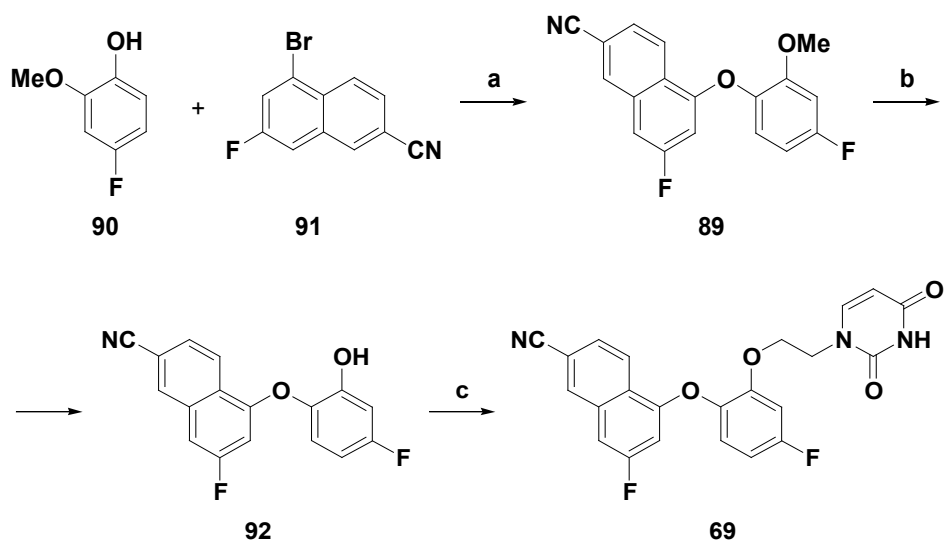


Схема 16. Условия и реагенты: (а) CuI , Cs_2CO_3 , 2-бром-5-фторанизол, 2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептандион, диоксан, 100°C , 48 ч; (b) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 3 ч; (с) **88**, K_2CO_3 , ДМФА, 60°C , 3 ч затем NH_4OH , CH_2Cl_2 , 16 ч, 28%.

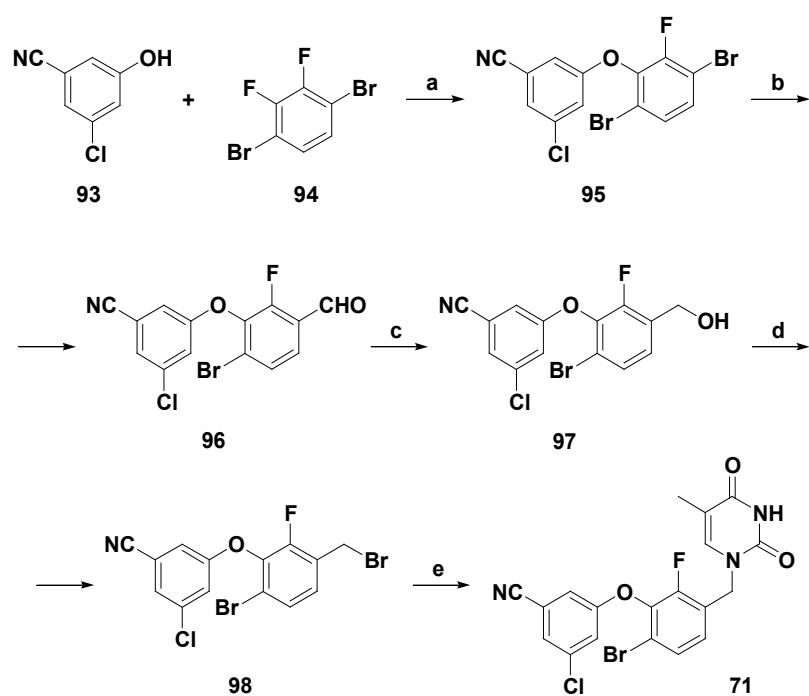


Схема 17. Условия и реагенты: а) NaN , ДМФА, 125°C , 2 ч; б) $i\text{-PrMgCl}$, $\text{CuCN}\cdot 2\text{LiCl}$, ТГФ, затем ДМФА, -78°C ; с) NaBH_4 , ТГФ- MeOH , 22°C , 24 ч; д) PBr_3 , CH_2Cl_2 , 22°C или MsCl , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 22°C , затем LiBr , ТГФ, 80°C ; е) тимин, KI , K_2CO_3 , MeCN , 85°C ; 90%.

Синтез соединения **71**, представленный на схеме 17, включает стадию конструирования дифенилового эфира (стадия А), превращения его в бромид (стадия В) и конденсацию с урацилом (стадия С)[107]. Взаимодействие 3-хлор-5-гидроксibenзонитрила **93** с избытком 1,4-дибром-2,3-дифторбензола **94** в присутствии

NaN в растворе ДМФА ведет с хорошим выходом к 3-хлор-5-(3,6-дибром-2-фторфенокси)бензонитрилу **95**, который действием *i*-PrMgCl и последующей обработкой ДМФА превращают в альдегид **96**. Далее его восстанавливают до бензинового спирта **97** с последующим превращением в бензилбромид **98**, которым алкилируют урацилы. Это ведет к образованию целевого продукта **71**.

Соединение **72** синтезировали путем, который включал взаимодействие 2,4,5-трихлорпиримидина **99** с 3-(4-гидрокси-3,5-диметилфенил)акрилонитрилом в присутствии карбоната калия в соответствии с ранее описанными условиями (схема 18)[117, 118]. В результате образовывался 2,5-дихлорпиримидин **100**, который в растворе N-метилпирролидона конденсировали с 1-(2-аминоэтил)урацилом [119] что вело к образованию целевого **72**.

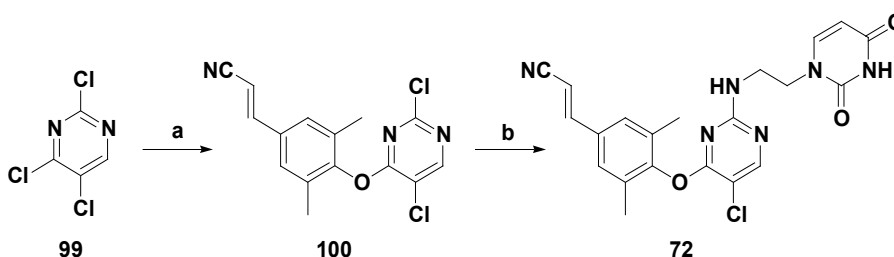


Схема 18. Условия и реагенты: (а) 3-(4-гидрокси-3,5-диметилфенил)акрилонитрил, K_2CO_3 , ДМФА, rt; (б) 1-(2-аминоэтил)урацил, DIPEA, NMP, 100°C, 60%.

1.4. 1,3-Дизамещенные урацилы

1.4.1. Эволюция структуры

Маруяма и др. описали синтез и противовирусные свойства большого числа 3-бензилпроизводных урацила, которые оказались активны как в отношении ВИЧ-1, так и в отношении HCMV. Было обнаружено, что исходный 1-цианометил-3-бензилурацил обладает слабовыраженными ингибиторными свойствами, однако введение метильных групп в мета-положение привело к заметному росту анти-ВИЧ-1 активности. 1-Цианометил-3-(3,5-диметилбензил)урацил **101** (рис. 16) имел EC_{50} 0.59 мкМ, его индекс селективности превысил 786. Введение в положение 1 урацила бензильного радикала заметно усилило анти-ВИЧ-1 активность: 1-бензил-3-(3,5-диметилбензил)урацил **102** ингибировал цитопатический эффект вируса (EC_{50} 0.234 мкМ), однако возросла и цитотоксичность, в итоге индекс селективности был равен 829. Введение атомов фтора в бензильный фрагмент (соединение **103**) усиливало анти ВИЧ-1 активность[120].

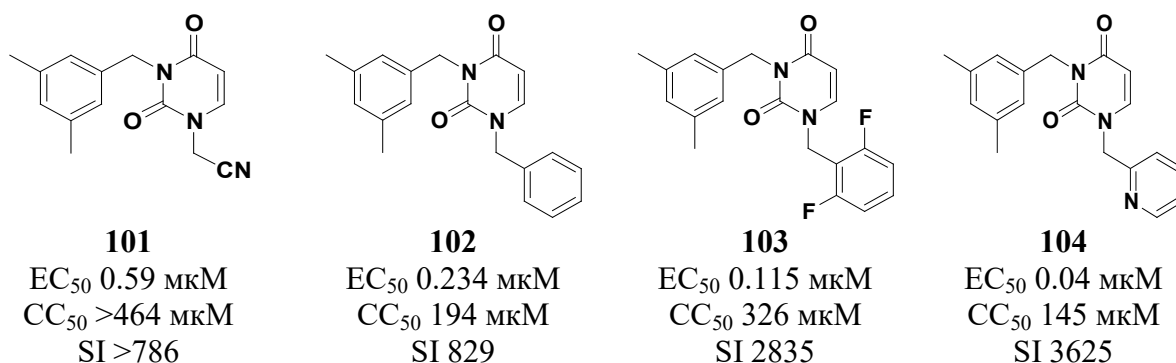


Рисунок 16. Структуры и свойства соединений **101-104**

Дальнейшие исследования показали, что введение гетероциклического фрагмента также способно усилить ингибиторные свойства. Так, 3-(3,5-диметилбензил)-1-(2-пиколил)урацил **104** (рис. 16) подавлял репликацию ВИЧ-1 с EC₅₀ 0.04 мкМ и имел индекс селективности 3625[121].

Были также изучены противовирусные свойства 6-замещенных производных 1-бензил-3-(3,5-диметилбензил)урацила. Показано высокая анти-ВИЧ-1 активность 6-азидо-1-бензил-3-(3,5-диметилбензил)урацила **105** (рис. 17) и 6-амино-1-бензил-3-(3,5-диметилбензил)урацила **106** (рис. 17) в культуре инфицированных клеток МТ-4[122]. Чтобы определить профили устойчивости этих соединений, было проведено культивирование ВИЧ-1-инфицированных клеток МТ-4 с возрастающими концентрациями каждого из них. После серийных пассажей клеток были получены варианты вируса, которые были более чем в 500 раз устойчивы к производным урацила **105** и **106** по сравнению с диким типом. Анализ последовательности ОТ мутантных вариантов ВИЧ-1 показал, что мутация Y181C в полимеразном домене ОТ была обнаружена для всех вирусов резистентных к **105** и **106**. Докинг-исследования с использованием кристаллической структуры ОТ показали, что для проявления ингибирующего действия соединения **106** в отношении ВИЧ-1 необходимо сохранение в ферменте аминокислотных остатков Leu100, Val106, Tyr181 и Trp229. Также были идентифицированы четыре дополнительных мутации (K451R, R461K, T468P и D471N) в домене РНКазы Н ОТ. Однако их роль в установлении устойчивости неясна[123].

Дальнейшие исследования привели к получению более активного соединения – 6-амино-3-(3,5-диметилбензил)-1-(4-пиколил)урацил **107** (рис. 17), которое подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 с EC₅₀ 0.03 мкМ и имело индекс селективности почти 3000. Докинг с использованием **107** в качестве лиганда показал, что 6-аминогруппа образует водородную связь с амидной группой остатка Lys101

(NH \cdots O=C), а 3,5-диметилбензильный фрагмент располагается в гидрофобной области, которую образуют остатки Tyr181, Tyr188, Trp229 и Leu234 ОТ ВИЧ-1. Азот 4-пиколильного фрагмента образует водородную связь с амидной группой остатка Lys101 (N \cdots H-N)[124].

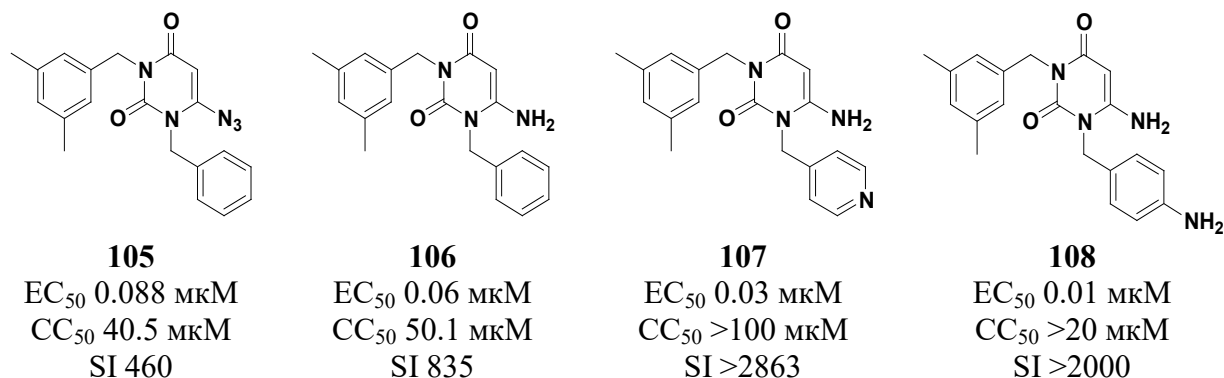


Рисунок 17. Структуры и свойства соединений **105-108**

Усиление анти ВИЧ-1 свойств было обнаружено у 6-амино-3-(3,5-диметилбензил)-1-(4-аминобензил)урацила **108** (рис. 17), который в культуре клеток МТ-4 блокировал репликацию ВИЧ-1 с EC₅₀ 0.01 мкМ и имел индекс селективности более 2000. Его докинг показал, что водород 6-аминогруппы образует водородную связь с амидной группой остатка Lys101 (NH \cdots O=C), 3,5-диметилбензильный фрагмент располагается в гидрофобной области и дает π - π стекинг с ароматическими кольцами остатков Tyr181 и Tyr188. Кроме того, СН- π взаимодействие наблюдалось между метильной группой 3,5-диметилбензильного фрагмента и индольным фрагментом остатка Trp229. Полученные результаты расчета для **108** были такими же, как и для 1-(4-пиколил)урацила **107**, однако **108** с 4-аминобензильной группой в положении N¹ имел более сильные ингибиторные свойства. Сделано предположение, что причиной этого является лучшая растворимость соединения **108** в воде. Аминогруппа 4-аминобензильного фрагмента **108** способна образовывать водородные связи с молекулами воды вне ОТ ВИЧ-1, что может стабилизировать лиганд **108** в гидрофобном кармане и, таким образом, усиливает активность против ВИЧ-1[125].

Синтезирован ряд 1-[2-(арилокси)этил]-3-бензил-производных урацила и изучены их противовирусные свойства. Было обнаружено, что наибольший анти-ВИЧ-1 эффект в культуре клеток СЕМ SS показал 1-[2-(4-метилфенокси)этил]-3-(3,5-диметилбензил)урацил **109** (рис. 18). Соединение ингибировало цитопатический эффект вируса в культуре СЕМ-SS клеток на 50% в концентрации EC₅₀ 0,27 мкМ и его индекс селективности превышал 1270.

В культуре клеток СЕМ SS, инфицированных ВИЧ-1, была протестирована еще одна группа соединений, содержащих в положении 1 циннамилный заместитель. Наиболее активными были 1-циннамил-3-(3,5-диметилбензил)урацил (**110**) (EC_{50} 1.27 мкМ, CC_{50} 257 мкМ) и 1-циннамил-3-(3,5-дибромбензил) урацил **111** (рис. 18) (EC_{50} 1.72 мкМ и CC_{50} 231 мкМ).

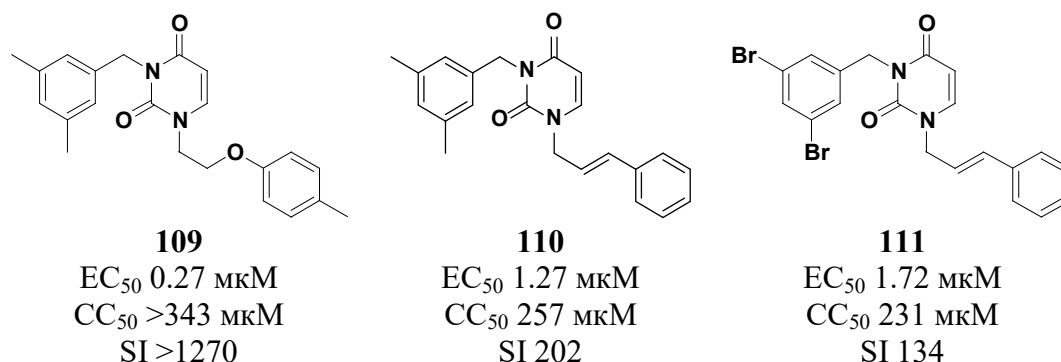


Рисунок 18. Структуры и свойства соединений **109-111**

Изучение ингибиторной активности соединений **109**, **110** и **111** в отношении изолированной ОТ ВИЧ-1 показало, что они подавляют фермент дикого типа в концентрации IC_{50} 0.26, 0.55 и 0.31 мкМ, соответственно, сохраняют выраженную активность против мутантов L100I и G190A, в гораздо более высоких концентрациях ингибируют ОТ с заменой V106A или Y181C, но не активны против двойного мутанта K103N / Y181C[126]. Было также обнаружено, что введение амидного фрагмента в состав мостика, соединяющего положение 1 урацила и арильный фрагмент, существенно снижает активность в отношении ВИЧ-1[127].

1.4.2. Синтез 1,3-дизамещенных производных урацила

1-Цианометил-3-(3,5-диметилбензил)урацил **101** был получен с выходом 65% в условиях реакции Митцунобу: обработка исходного 1-цианометилурацила **112**, синтез которого описали Сингх и соавторы[128], 3,5-диметилбензиловым спиртом в присутствии избытка трифенилфосфина и диизопропилазодикарбоксилата (DIAD) в растворе ТГФ (см. схему 19).

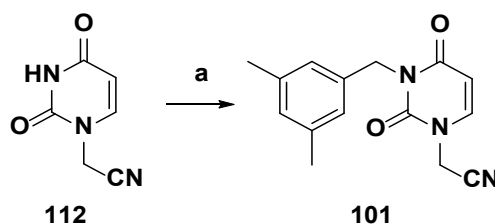


Схема 19. Условия и реагенты: а) ТГФ, 3,5-диметилбензиловый спирт, PPh_3 , DIAD, 50°C ; 65%.

Для синтеза 3-(3,5-диметилбензил)-1-(2-пиколил)урацила **104** Маруяма и соавторы[121] разработали другой подход, ключевым соединением в котором является 3-(3,5-диметилбензил)урацил **113**. Его синтез заключается в обработке 1-(тетрагидрофуран-2-ил)урацила **114**[129] 3,5-диметилбензиловым спиртом в присутствии избытка трифенилфосфина и DIAD в растворе ТГФ. При этом выход 3-(3,5-диметилбензил)-1-(тетрагидрофуран-2-ил)урацила **115** составляет 68%. Его гидролиз 1М HCl дает N-3-замещенный урацил **113** с выходом 69%. Обработка соединения **113** гидрохлоридом 2-пиколилхлорида в растворе ДМФА в присутствии карбоната калия приводит к целевому соединению **104** с выходом 86% (см. схему 20).

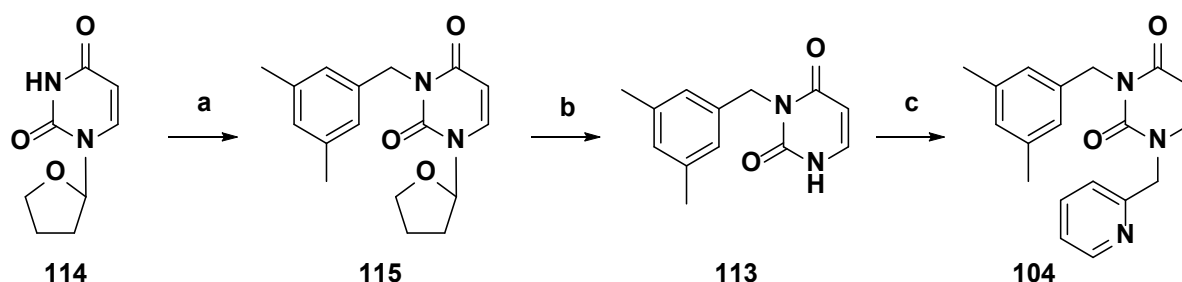


Схема 20. Условия и реагенты: а) ТГФ, 3,5-диметилбензиловый спирт, PPh_3 , DIAD, 50°C , ночь; б) 1М HCl , 1,4-диоксан, кипячение, 15 ч; в) гидрохлорид 2-пиколилхлорида, ДМФА, K_2CO_3 ; 86%.

Синтетический путь к 6-амино-3-(3,5-диметилбензил)-1-(4-аминобензил)урацилу **108** показан на схеме 21. Избыток 6-хлорурацила **116** обрабатывают 4-нитробензилбромидом в растворе ДМФА в присутствии карбоната калия что ведет к 6-хлор-1-(4-нитробензил)урацилу **117**, выход которого составляет 75%. В условиях реакции Мицунобу соединение **117** конденсируют с 3,5-диметилбензиловым спиртом в присутствии избытка PPh_3 и N,N,N',N' -тетраметиладикарбоксимид (TMAD) в растворе ТГФ что дает 1-бензил-6-хлор-3-(3,5-диметилбензил)урацил **118** с выходом 69%. При его обработке азидом натрия в растворе ДМФА при комнатной температуре с выходом 90% образуется производное **119**. Восстановление азидо-группы соединения **119**

алюмогидридом лития с выходом 71% приводит к 6-амино-производному **120**, которое в условиях, описанных Уайтом[130], превращают в целевой 6-амино-1-(4-аминобензил)-3-(3,5-диметилбензил)урацил **108** с выходом 80%.

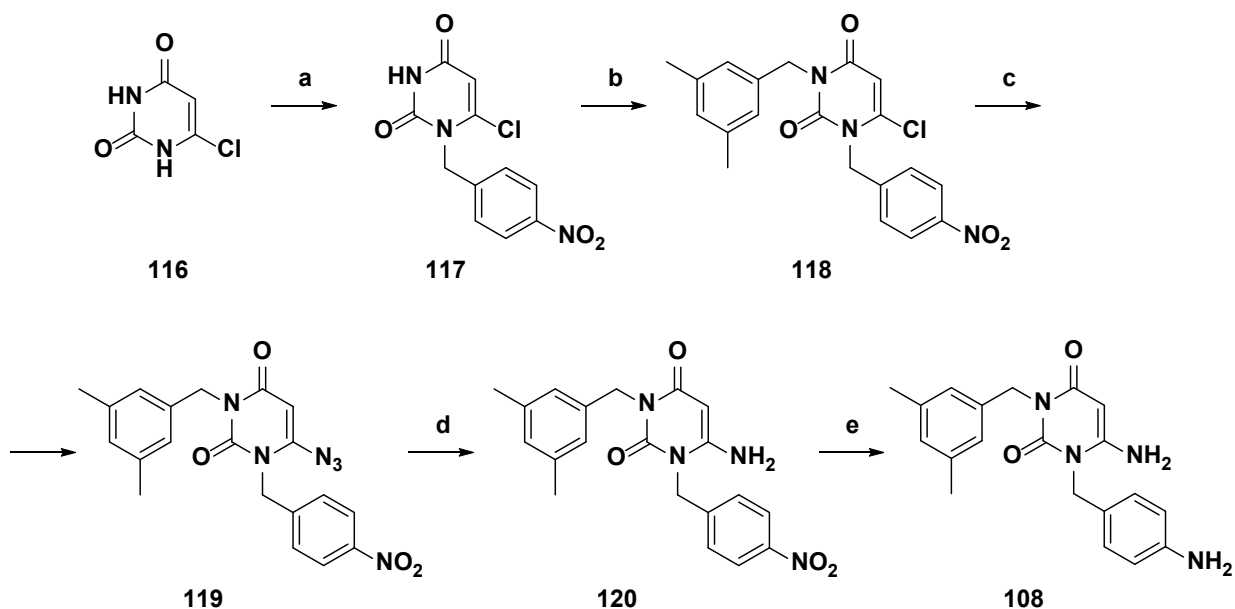


Схема 21. Условия и реагенты: а) 4-нитробензилбромид, ДМФА, K_2CO_3 , $70^\circ C$, 1 ч; б) ТГФ, 3,5-диметилбензиловый спирт, PPh_3 , TMAD, $50^\circ C$, 12 ч; в) NaN_3 , ДМФА, rt, 30 мин; д) $LiAlH_4$, ТГФ, $0^\circ C$, 0.5 ч; е) $NaBH_4$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, MeOH, ТГФ, $0^\circ C$, 30 мин.

Синтез 6-амино-3-(3,5-диметилбензил)-1-(4-пиколил)урацила **107**, описанный Сакакибара и соавторами[124], представлен на схеме 22. В качестве исходного так же используют коммерчески доступный 6-хлорурацил **116**, который обрабатывают метоксиметилхлоридом в растворе хлористого метилена в присутствии DBU, что ведет к 6-хлор-1-метоксиметилурацилу **121** с выходом 90%. Конденсация производного урацила **121** в условиях реакции Мицунобу с 3,5-диметилбензиловым спиртом в присутствии избытка PPh_3 и TMAD в растворе ТГФ дала 3-(3,5-диметилбензил)-производное **122** с выходом 93%. Его гидролиз под действием В-бромкатехолборана в растворе хлористого метилена ведет к смеси 6-хлор- и 6-бром-производным **123** и **124** в соотношении 4:1 с выходом 72%, которые без разделения обрабатывают последовательно избытком гидрохлорида 4-(хлорметил)пиридина в растворе ДМФА в присутствии карбоната калия, а затем азидом натрия. 6-Азидо-3-(3,5-диметилбензил)-1-(4-пиколил)урацил **125** образуется с выходом 59% (на две стадии). Его восстановление алюмогидридом лития приводит к целевому 6-амино-производному **107** с выходом 74%.

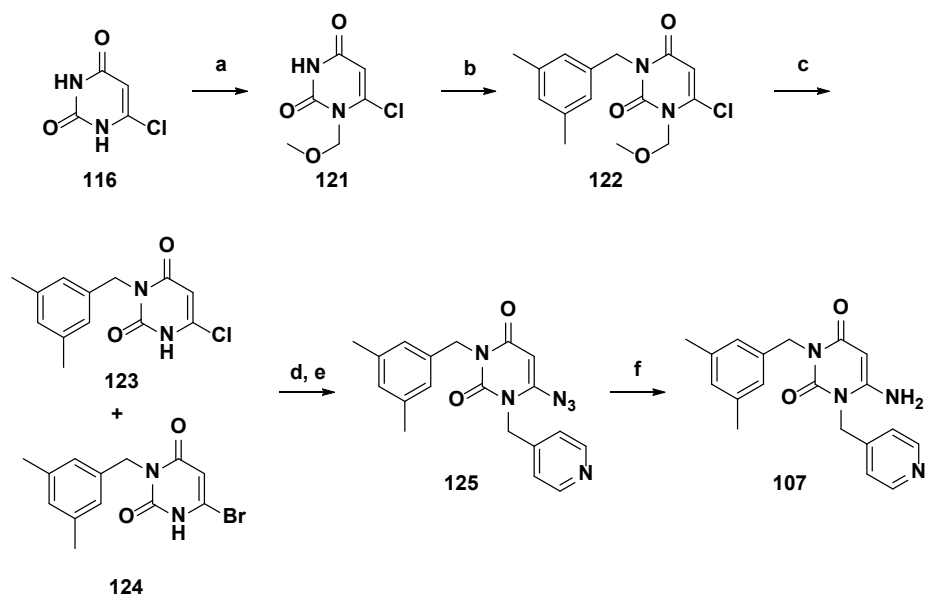


Схема 22. Условия и реагенты: а) $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$, DBU, CH_2Cl_2 , 0°C , 20 мин; б) 2,6-диметилбензиловый спирт, TMAD, PPh_3 , 50°C , 2 ч; в) В-бромкатехолборан, CH_2Cl_2 , rt, 1 ч; д) гидрохлорид 4-(хлорметил)пиридина, ДМФА, K_2CO_3 ; е) NaN_3 , ДМФА, rt, 30 мин; ф) LiAlH_4 , ТГФ, 0°C , 5 мин.

Синтез 3-(3,5-диметилбензил)-1-[2-(4-метилфенокси)этил]урацила **109**, представленный на схеме 23, включал в себя две стадии[112]. Конденсация эквимольных количеств 2,4-бис(триметилсилил)урацила **126** и 1-бром-2-(4-метилфенокси)этана при нагревании до $170\text{--}180^\circ\text{C}$ без растворителя в течение 2 ч и последующая обработка образовавшегося 1-[2-(4-метилфенокси)этил]урацила **127** 3,5-диметилбензибромидом в растворе ДМФА в присутствии карбоната калия позволяют получить целевое соединение **109** с выходом 80%.

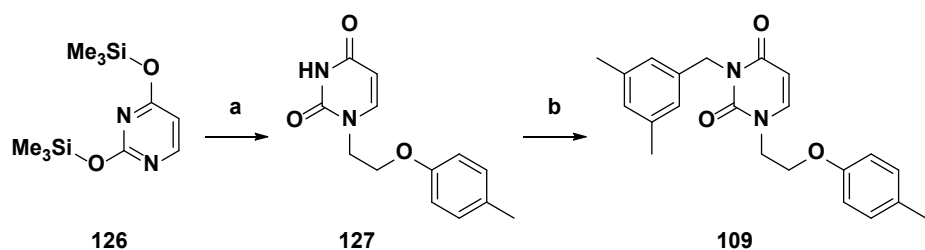


Схема 23. Условия и реагенты: а) 1-бром-2-(4-метилфенокси)этан, $170\text{--}180^\circ\text{C}$, 2 ч; б) 3,5-диметилбензибромид, K_2CO_3 , ДМФА, 80°C , 24 ч.

В ряду 1-циннамил-производных урацила наибольший интерес представляет 1-циннамил-3-(3,5-дибромбензил)урацил **110**, синтез которого (схема 24) также включает в себя две стадии. Первая стадия заключалась в конденсации 2,4-бис(триметилсилилокси)пиримидина **126** с циннамилбромидом. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в 1,2-дихлорэтане в течение 20 часов и получили 1-

циннамилурацила **128** с выходом 90%. Затем 1-циннамилурацил **128** обрабатывали 3,5-дибромбензилбромидом в растворе ДМФ в присутствии избытка поташа при комнатной температуре. Целевое соединение **110** было выделено с выходом 81%[126].

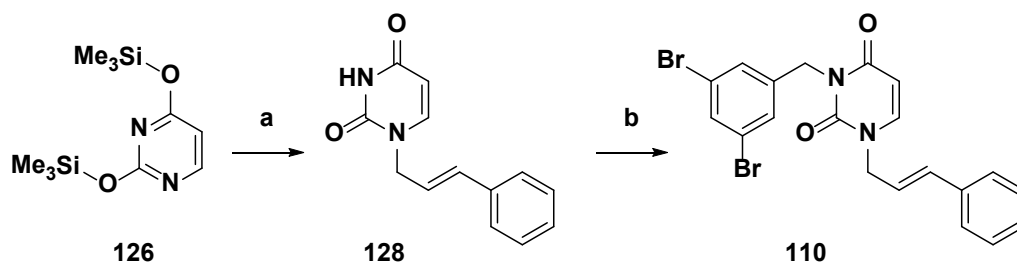


Схема 24. Условия и реагенты: а) циннамилбромидом, 1,2-дихлорэтан, Δ , 20 ч; б) 3,5-дибромбензилбромид, K_2CO_3 , ДМФА, 80°C.

1.5. Аналоги нуклеозидов в качестве ННИОТ ВИЧ

Отдельным классом ННИОТ ВИЧ являются аналоги пиримидиновых нуклеозидов, с определенными модификациями углеводного фрагмента.

1.5.1. Аналоги нуклеозидов с 3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксид)-модификацией углеводного фрагмента.

Первые представители данного класса ННИОТ ВИЧ-1 были описаны Камараза и др. в 1992 г.[131]. Исследования зависимости активности от структуры большого числа производных показали, что присутствие 3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксидной) группы в 2',5'-ди(*трет*-бутилдиметилсилил)рибонуклеозидах имеет определяющее значение для проявления активности в отношении ВИЧ-1. Модификации гетероциклического основания в аналогах данного типа меньше влияют на активность, чем природа сахарного фрагмента. Наиболее активным соединением оказался [1-[2',5'-бис-*O*-(*трет*-бутилдиметилсилил)- β -D-рибофуранозил]тимин]-3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксид) **129** (TSAO-T)[132]. Соединение **129** (рис. 19) продемонстрировало EC_{50} 0.06 мкМ в культуре клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, однако оказалось довольно токсичным. По этой причине индекс селективности был низким и составил 227. Изучение механизма действия показало, что **129** (TSAO-T) в культурах клеток МТ-4 и СЕМ способен подавлять репликацию не только дикого штамма ВИЧ-1, но и вариантов вируса, резистентных к AZT. TSAO-T и его аналоги ингибируют активность изолированной ОТ ВИЧ-1 с EC_{50} 6.3-7.1 мкМ[133]. В этой же работе было

показано, что удаление хотя бы одной *трет*-бутилдиметилсилильной группы приводит к полной потере анти-ВИЧ-1 активности.

| | 129 (TSAO-T) | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 |
|------------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| R = | H | Me | | | | |
| EC ₅₀ , мкМ | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.03 | 0.02 | 0.033 |
| CC ₅₀ , мкМ | 14 | 240 | >130 | | ≥250 | 11 |
| SI | 227 | 4088 | >2160 | | 12500 | 333 |

Рисунок 19. Структуры и свойства соединений **129-134**

Следующим этапом было изучение противовирусных свойств *N*³-замещенных производных TSAO-T. Было обнаружено, что введение липофильного (алкильного или аллильного) фрагмента в *N*³ пиримидинового кольца приводит к значительному снижению цитотоксичности без падения анти-ВИЧ-1 активности, что позволило получить производные с более высоким, чем у TSAO-T **129** индексом селективности. Наиболее активным оказался [1-[2',5'-бис-*O*-(*трет*-бутилдиметилсилил)-β-D-рибофуранозил] 3-*N*-метилтимин]-3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксид) **130** (рис. 19), ингибировавший репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток MT-4 с EC₅₀ 0.059 мкМ. Цитотоксичность данного соединения составляла CC₅₀ 240 мкМ, и его индекс селективности превысил 4000[134]. Показано также, что **130** способен блокировать димеризацию субъединиц р66 и р51 гетеродимера ОТ ВИЧ-1[135]. Сходную анти-ВИЧ-1 активность в культуре клеток MT-4 и CEM показала смесь 3-[(*E*)- и (*Z*)-4-оксопент-2-ен-2-ил)оксипропил]-TSAO-T **131** (рис. 19) в соотношении 2:1, EC₅₀ 0.06 мкМ и CC₅₀ >130 мкМ[136].

С помощью компьютерного моделирования были получены соединения с улучшенными противовирусными свойствами. Так, 3-(3-гидроксипропил)-TSAO-T **132** (рис. 19) в культуре клеток MT-4 подавлял репликацию ВИЧ-1 в концентрации EC₅₀ 0.03 мкМ, а в культуре клеток CEM EC₅₀ составила 0.01 мкМ[137].

Следующим этапом явилось введение в положение N^3 TSAO-Т полярного амидного фрагмента – N -метилацетамида **133** (рис. 19). Соединение ингибировало репликацию вируса в культуре клеток МТ-4 в концентрации EC_{50} 0.03 мкМ и в концентрации EC_{50} 0.02 мкМ в культуре клеток СЕМ. При этом индекс селективности соединения **133** составил 12500[138].

Введение в положение N^3 TSAO-Т заместителей, содержащих дикарбонильные фрагменты, позволило получить соединения, проявляющие ингибиторную активность как в отношении ВИЧ-1, так и в отношении вируса гепатита С (HCV). Однако, если производные TSAO-Т активны против ВИЧ-1 в наномолярных концентрациях, то активность в отношении HCV наблюдалась в микромолярном диапазоне, то есть при концентрациях, которые были цитостатическими для человеческих Т-лимфоцитов. Наиболее интересным оказалось 3-(*трет*-бутоксиглутарил)-производное TSAO-Т **134** (рис. 19), которое подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ клеток в концентрации EC_{50} 0.033 мкМ. При этом цитотоксичность соединения была достаточно высокой: CC_{50} 11 мкМ. EC_{50} в отношении HCV совпадала с CC_{50} (11 мкМ)[139].

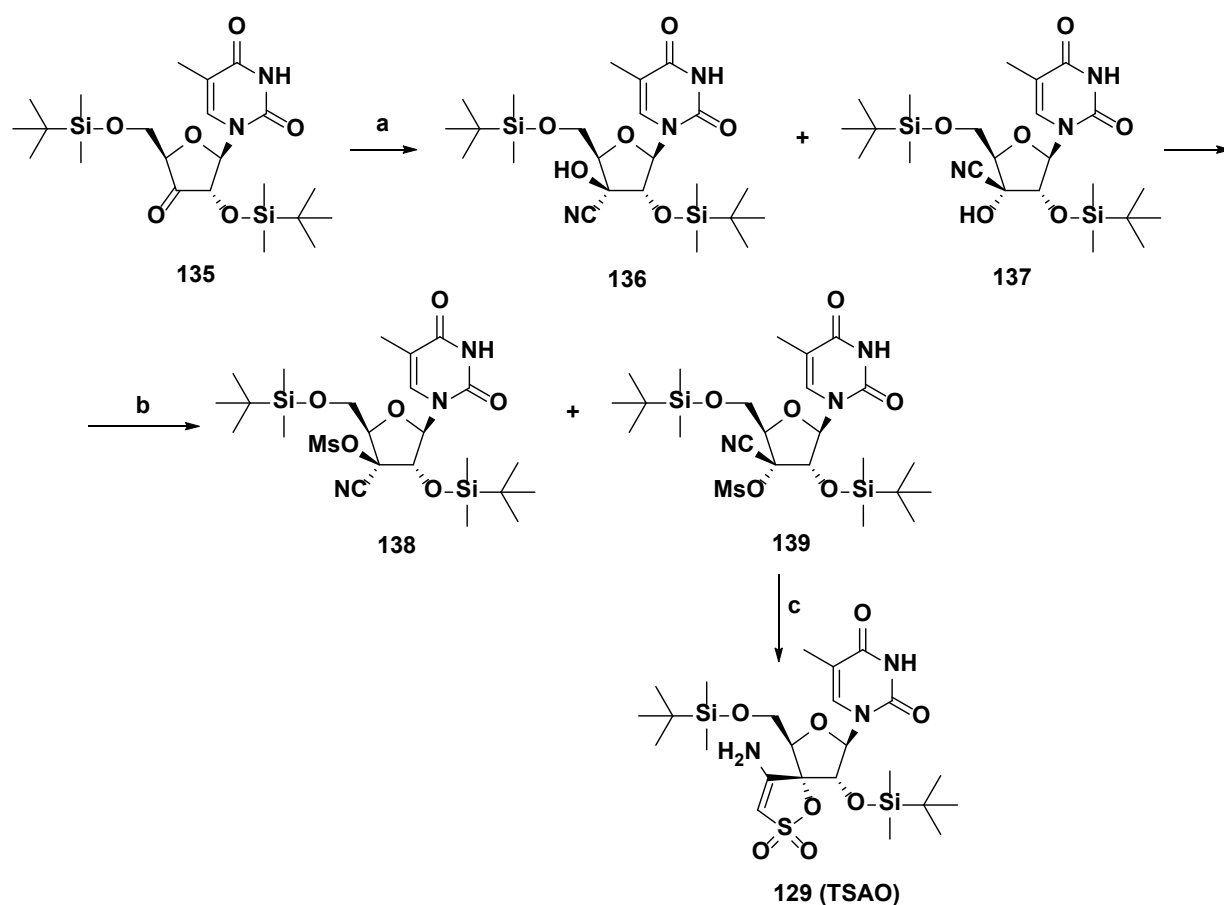


Схема 25. Условия и реагенты: а) NaCN, NaHCO₃, Et₂O-H₂O (2 : 1), rt, 16 ч; б) MsCl, Py, 8-10°C, 48 ч; в) MeCN, Cs₂CO₃, rt, 6 ч.

Синтез **129** (TSAO-T), представленный на схеме 25, включает в себя несколько стадий и основан на работе Кальво-Матео и соавторов[140], в которой описано получение 3'-кето-нуклеозида **135** исходя из 1-(β -D-рибофуранозил)тимина. Взаимодействие **135** с цианидом натрия в двухфазной системе этиловый эфир/ вода в присутствии бикарбоната натрия приводит к образованию смеси двух эпимерных 3'-циангидриннуклеозидов **136** и **137**. Эти циангидрины неустойчивы и при стоянии дают исходный 3'-кето-нуклеозид **135**, поэтому их смесь без выделения обрабатывают мезилхлоридом в пиридине что приводит к образованию соответствующих 3'-C-циано-3'-O-мезил-ксило-**138** (53%) и 3'-C-циано-3'-O-мезил-рибо-**139** (10%) производных тимина, которые разделяют хроматографически. Обработка 3'-O-мезилата **139** карбонатом цезия приводит к образованию продукта **129** с выходом 87%.

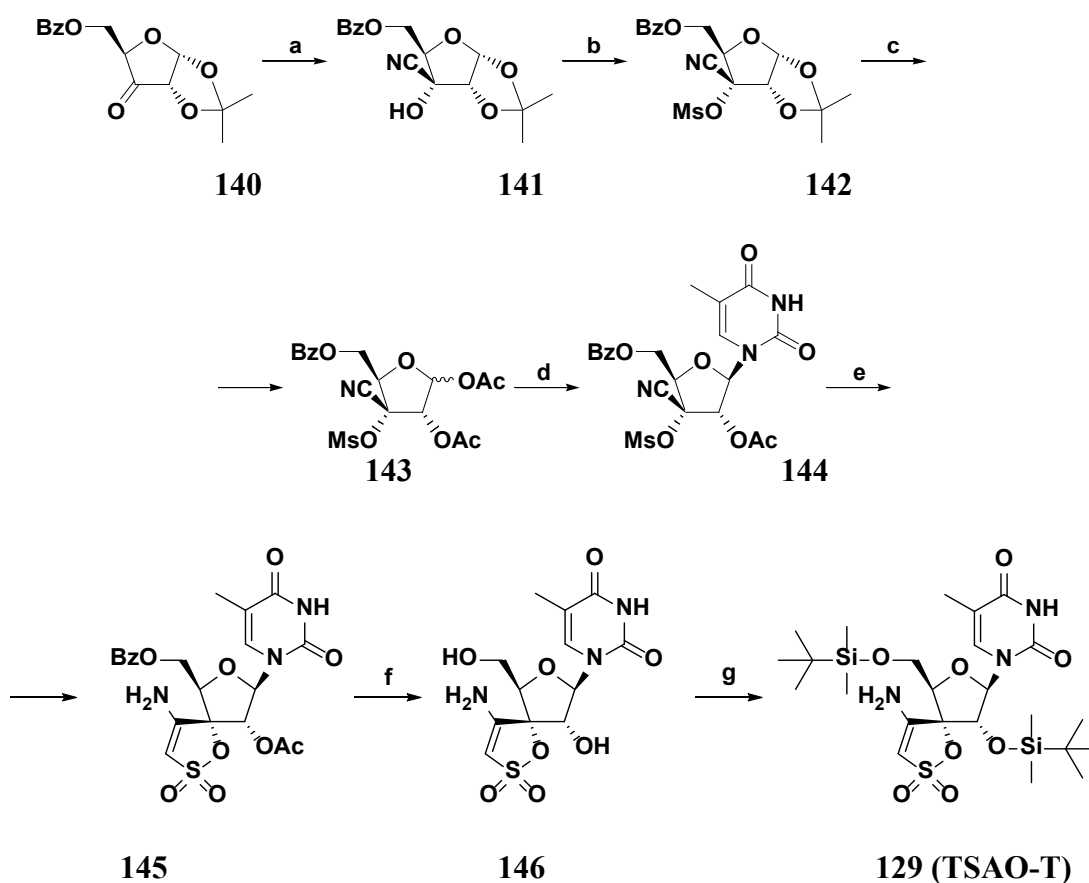


Схема 26. Условия и реагенты: а) NaCN, NaHCO₃, Et₂O-H₂O (2:1), rt, 4 ч; б) мезил хлорид, Py, 8-10°C, 16 ч; в) (i) TFA/H₂O (9:1), rt, 4 ч; (ii) Ac₂O, Py, rt, ночь; д) 2,4-бис(триметилсилилокси)-5-метилпиримидин, MeCN, триметилсилiltrифлат, 2 ч; е) MeCN, Cs₂CO₃, rt, 3 ч; ф) NH₃/MeOH, rt, ночь; г) *трет*-бутилдиметилсилил хлорид, MeCN, 4-(диметиламино)пиридин, rt, 24 ч.

Альтернативный, более удобный путь получения **129** (TSAO) был предложен Перес-Перес и соавторами[134] (схема 26). Он основан на использовании 5-O-бензоил-1,2-

O-изопропилиден- α -D-эритро-пентофурано-3-улозы **140**[141], которую обрабатывали цианидом натрия в двухфазной системе этиловый эфир/ вода в присутствии бикарбоната натрия, что кинетически контролируемо приводило к образованию рибо-циангидрина **141**. Образование соединения **141** согласуется с атакой иона цианида со стерически менее затрудненной, противоположной от 1,2-*O*-изопропилиденовой группы стороны улозы **140**. Цианогидрин **141** без выделения и дополнительной очистки преобразовывали в мезилат **142** (выход на две стадии 78%). Гидролиз 1,2-*O*-изопропилиденовой группы **142** водной трифторуксусной кислотой (TFA) с последующей реакцией с уксусным ангидридом в пиридине давал (1,5: 1) смесь двух аномерных форм (α и β) производного диацетата **143** с выходом 95%. Конденсация соединения **143** с силилированным тимином с использованием триметилсилилтрифлата, как описано Форбрюггеном и соавторами[142], приводила к 3'-циано-3'-мезилатному нуклеозиду **144** с выходом 77%. Присутствие 2'-*O*-ацильной группы обеспечивало селективное получение исключительно β -аномеров. Обработка соединения **144** давала спиро-производное **145** с выходом 65%. Удаление защитных групп **145** насыщенным метанольным аммиаком позволяло получить нуклеозид **146** с выходом 66%. Обработка **146** *трет*-бутилдиметилсилилхлоридом давала 2',5'-бис-*O*-силилированный нуклеозид **129**.

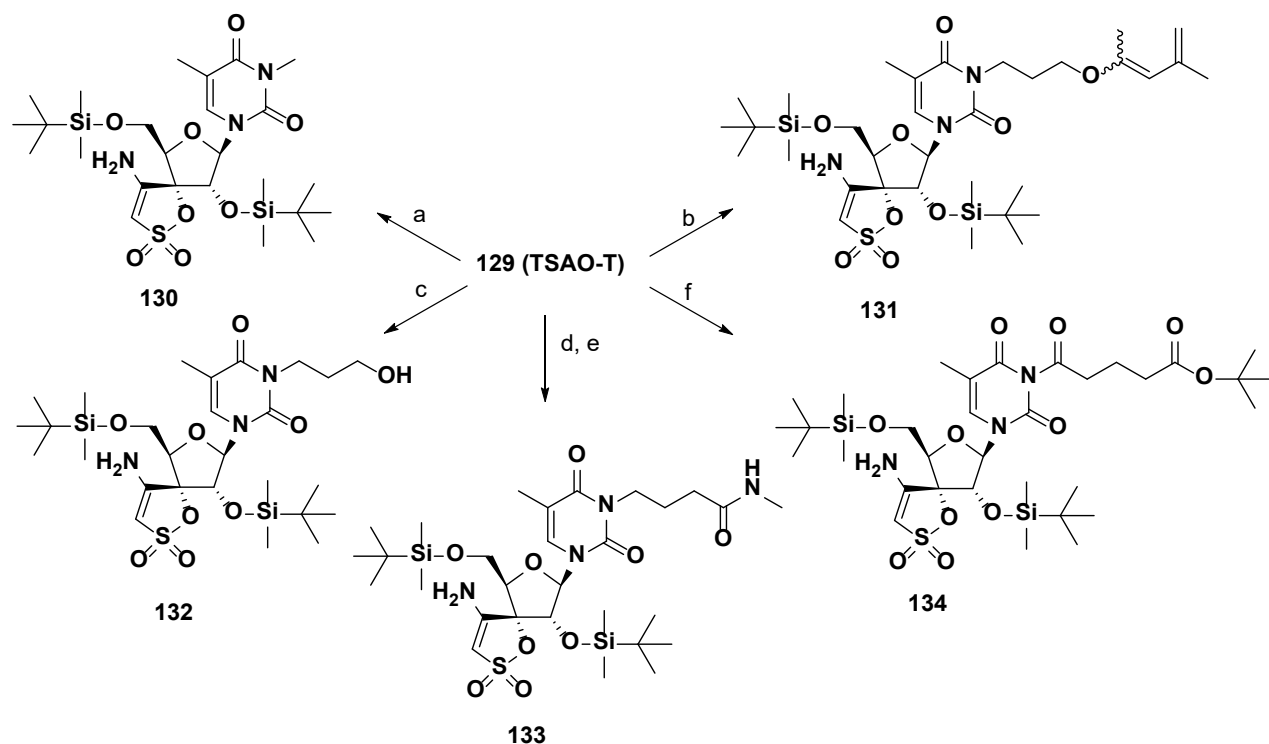
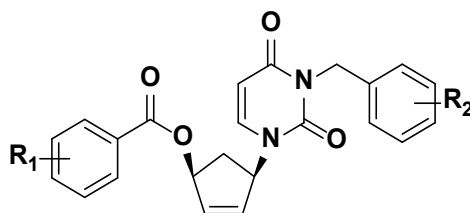


Схема 27. Условия и реагенты: а) MeI, ацетон, K_2CO_3 , 4 ч, 55%; б) 4-(3-бромпропилокси)пент-3-ен-2-он (смесь *Z* и *E* стереоизомеров, 1:4), ацетон, K_2CO_3 , 7 ч, 64%; в) 3-бромпропанол, ацетон, K_2CO_3 , 6 ч, 78%; д) метил-5-бромовалерат, ацетон, K_2CO_3 , 6 ч, 71%; е) метиламин (33% в этаноле), rt, 2 ч, 50%; ф) глутарил дихлорид, Na_2CO_3 , Bu_4NBr , CH_2Cl_2/H_2O (1:2), 8°C, 15 мин, затем *t*-BuOH, rt, 15 мин, 62%.

Синтез N^3 -замещенных производных TSAO-T показан на схеме 27[134, 136-139]. Соединения **130-133** получали с выходами 55-78% алкилированием **129** в присутствии поташа в ацетоне. Финальной стадией в случае производного **133** была обработка раствором метиламида в этаноле[138]. 3-*N*-(*трет*-бутоксиглутарил) замещенный аналог **134** получали в результате реакции TSAO-T **129** с глутарил дихлоридом и последующего образование *трет*-бутилового эфира с общим выходом 62% на две стадии[139].

1.5.2. 5'-Норкарбоциклические аналоги 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина

Производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-урацила с заместителями по 4'-гидроксильной группе и 3 положению гетероциклического основания представляют собой еще одну группу ННИОТ ВИЧ-1. Заметную активность на выделенном ферменте ОТ ВИЧ-1 показали соединения **135-138** (рис. 20), константы ингибирования которых составили 5-19 мкМ.



135: $R_1=R_2=H$ **136:** $R_1=H, R_2=4-Me$ **137:** $R_1=3,5-Me_2, R_2=H$ **138:** $R_1=3,5-Cl_2, R_2=H$

Рисунок 20. Структуры соединений **135-138**

Данные соединения были изучены в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1, несущих замены L100I и K103N. Оказалось, что при замене L100I активность производных была примерно на порядок выше, чем на ОТ ВИЧ-1 вируса дикого типа, величины K_i для них составили 1,2-2,4 мкМ, а на ферменте с мутацией K103N активность падала всего в 2-3 раза, K_i 8,8-55,4 мкМ[143, 144].

Синтез проводили исходя из 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентенил)урацила **139** (Схема 28), получение которого было описано ранее[145]. Исходный 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацил **139** ацилируют бензоил-, 3,5-диметилбензоил- или 3,5-дихлорбензоилхлоридом в растворе пиридина при 36°C в течение 1 ч с образованием 1-[4'-(бензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил]урацила **140**, 1-[4'-(3,5-диметилбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил]урацила **141** или 1-[4'-(3,5-дихлорбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил]урацила **142**. Их обработка соответствующим

бензил бромидом приводит к 3-*N*-бензил-производным **135-138** с выходом 65-85%[143, 144].

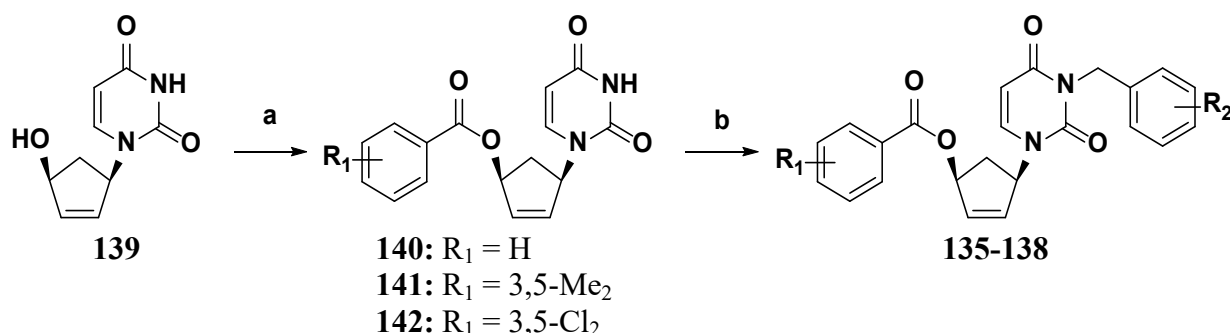


Схема 28. Условия и реагенты: а) бензоил-, 3,5-диметилбензоил- или 3,5-дихлорбензоилхлорид, Р_у, rt; б) бензил бромид или 4-метилбензилбромид, K₂CO₃, ДМФА.

1.6. Производные урацила с двойной активностью в отношении ВИЧ

Обратная транскриптаза ВИЧ-1 выполняет несколько каталитических функций: (1) синтез провирусной ДНК на матрице геномной РНК с образованием комплекса РНК-ДНК (РНК-зависимая ДНК полимеризация), (2) гидролиз комплекса РНК-ДНК и высвобождение цепи ДНК (рибонуклеазная Н активность), (3) синтез второй цепи ДНК и образование двухцепочечной провирусной ДНК (ДНК-зависимая ДНК полимеризация). Если активный центр полимеразной активности ОТ локализован у подножья домена «большой палец», то активный центр, отвечающий за рибонуклеазную Н активность, расположен в домене «connection»[146]. Расстояние между этими двумя центрами оценивается приблизительно в 18 пар нуклеиновых оснований (рис.1). Обнаружено, что для осуществления рибонуклеазной Н активности в состав активного центра должно входить два катиона металла Mg²⁺ или Mn²⁺[147]. Именно эти катионы могут служить хорошей мишенью для ингибиторов ОТ, которые способны образовывать с ними различные хелатные комплексы.

Еще одной удачной мишенью для химиотерапевтического воздействия на ВИЧ-1 является интеграз (IN), которая отвечает за включение провирусной ДНК в ДНК клетки-хозяина. Интеграция является одной из ключевых стадий в жизненном цикле вируса. В состав активного сайта интегразы входит катион металла Mg²⁺, который играет важную роль в конформации фермента и его взаимодействии с клеточной ДНК, образуя стабильный комплекс IN-металл-ДНК[148]. Активный центр интегразы содержит каталитическую триаду из трех высококонсервативных остатков – одной глутаминовой и двух аспарагиновых кислот. Было обнаружено, что катионы Mg²⁺ координируются двумя

консервативными остатками аспарагиновой кислоты каталитической триады, опосредуя их каталитическую активность[149]. Катионы Mg^{2+} могут служить хорошей мишенью для ингибиторов ИН, которые способны образовывать с ними различные хелаты. По этой причине хелатирующие соединения могут обладать как способностью ингибировать активность рибонуклеазы Н (РНКаза Н), так и ИН.

1.6.1. Ингибиторы ОТ и ИН

Описаны бифункциональные химерные ингибиторы, в основе которых лежат структуры ННИОТ ВИЧ-1 производные НЕРТ и ингибиторы интегразы (ИН) – дикетокислоты и хинолон[150, 151]. Биохимические исследования выявили активность против ОТ и ИН в наномолярных и микромолярных концентрациях, соответственно. Соединение **143** (рис. 21) показало наилучшие ингибиторные свойства в серии химерных соединений (IC_{50} 24 нМ против ОТ и 4,4 мкМ против ИН, EC_{50} 10 нМ против ВИЧ-1)[150].

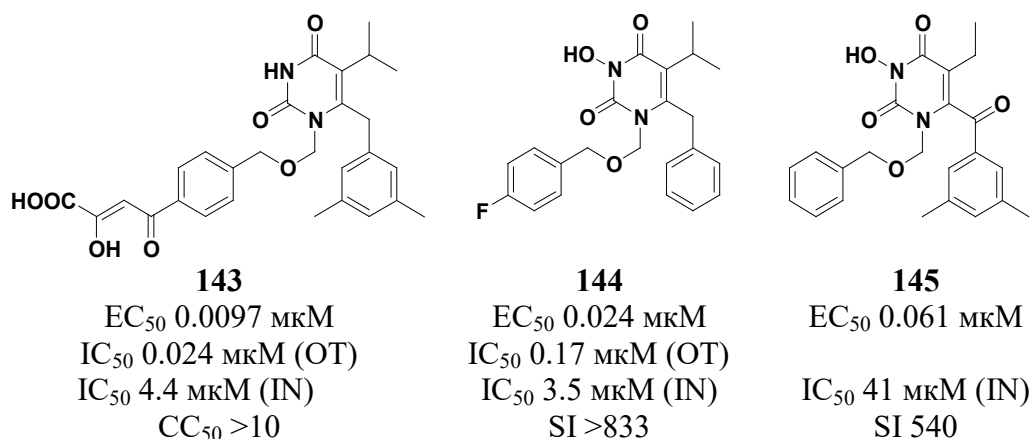


Рисунок 21. Структуры и свойства соединений **143-145**

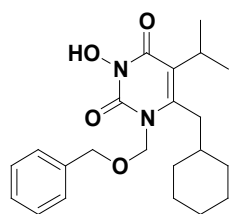
Введение *N*-гидроксильной группы в структуру ингибиторов ОТ таких, как НЕРТ привело к открытию нового класса ингибиторов репликации ВИЧ-1, обладающих активностью, как в отношении ОТ, так и ИН. N^3 -гидроксилирование пиримидинового кольца в НЕРТ-производных ведет к появлению в молекуле хелатирующей катионы Mg^{2+} триады, которая, наряду с бензильной группой, по-видимому, удовлетворяет основным структурным требованиям для ингибирования ИН. Между тем, эта химическая модификация не сильно повлияла на способность соединения ингибировать ОТ. Исследование закономерности структура-активность (SAR) показывает, что наличие N^3 -ОН-группы является необходимым условием для ингибирования ИН, а бензильная группа

в боковой цепи при N^1 более важна для блокирования IN, чем бензильная группа при C^6 урацильного остатка. Наилучшие свойства показало соединение **144** (рис. 21), которое подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток в концентрации EC_{50} 0.024 мкМ и подавляло вирусные ферменты IC_{50} 0.17 мкМ (ОТ) и 3.5 мкМ (IN)[152, 153].

В продолжении этих исследований была синтезирована серия 6-бензоил-производных урацила, которые изначально являлись ингибиторами ОТ. Было обнаружено, что N^3 -гидроксилированные производные данной группы соединений обладают двойной активностью как в отношении ОТ, так и IN в микромолярном диапазоне. Исследования показали, что эти новые ингибиторы активны в отношении ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток. Наиболее интересным соединением оказалось соединение **145** (рис. 21), которое подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток в концентрации EC_{50} 0.061 мкМ и подавляло IN IC_{50} 0.41 мкМ[154].

1.6.2. Ингибиторы полимеразной и рибонуклеазной активностей ОТ ВИЧ

Замещение бензильной группы в 6 положении урацила на циклогексилметильный фрагмент привело к новому классу ингибиторов ОТ ВИЧ-1. У соединений данной группы отсутствовала активность в ингибировании IN, однако было обнаружено подавление рибонуклеазной активности ОТ. Соединение **146** (рис. 22) оказалось наиболее активным в ряду данных соединений. Оно блокировало репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток в концентрации EC_{50} 0.026 мкМ, ингибировало активность рибонуклеазы H в концентрации IC_{50} 5.2 мкМ и блокировало полимеразную активность ОТ в концентрации IC_{50} 0.45 мкМ[155].



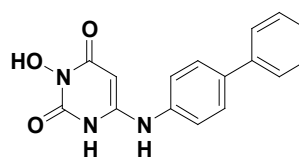
146

EC_{50} 0.026 мкМ

IC_{50} 5.2 мкМ (RNase H)

IC_{50} 0.45 мкМ (Pol)

CC_{50} >100



147

IC_{50} 2.0 мкМ (RNase H)

IC_{50} 0.45 мкМ (Pol)

CC_{50} >25

Рисунок 22. Структуры и свойства соединений **146-147**

Известен другой класс ингибиторов рибонуклеазной активности ОТ, соединения которого содержат в своем составе N^3 -ОН группу, отвечающую за хелатирование катионов Mg^{2+} , и диарильный фрагмент, связанный с остатком урацила коротким мостиком (NH, O, S, CH_2 , или CO). Наибольший интерес из серии 6-(4-фенилфениламино)-производных 3-гидроксиурацила представляет соединение **147** (рис. 22), которое ингибировало рибонуклеазную активность ОТ в концентрации IC_{50} 2.0 мкМ и блокировало полимеразную активность ОТ в концентрации IC_{50} 0.45 мкМ. В то же время соединение оказалось неактивным в отношении IN[156].

1.6.3. Ингибиторы активностей РНКазы Н и интегразы.

Последующая модификация структуры была связана с заменой NH-мостика, связывающего диарильный фрагмент с остатком урацила, на атом серы. Это заметно усилило ингибиторные свойства соединений. Соединение **148** (рис. 23) ингибировало рибонуклеазную активность ОТ с IC_{50} 0.005 мкМ и блокировало полимеразную активность ОТ с IC_{50} 10 мкМ. Кроме того, соединение подавляло активность IN с IC_{50} 4.0 мкМ и блокировало репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток с EC_{50} 0.061 мкМ[157]. Замена атома серы на CH_2 -группу или C(O)-группу заметно понижала противовирусный эффект[158, 159].

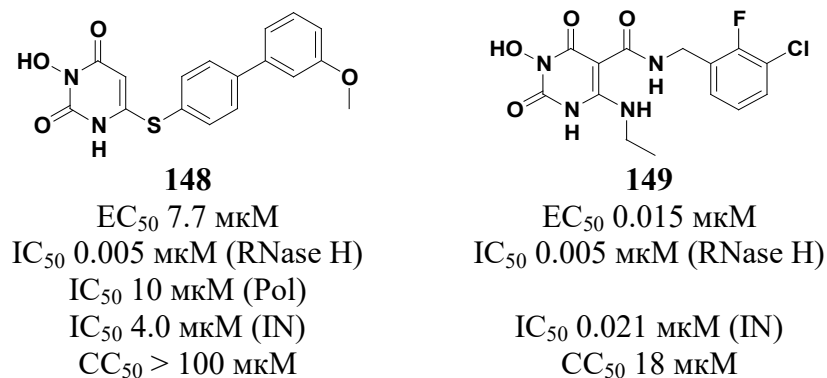


Рисунок 23. Структуры и свойства соединений **148-149**

Весьма интересным оказалось соединение **149** (рис. 23), являющееся производным 6-амино-3-гидроксиизоуротовой кислоты. Соединение подавляло репликацию ВИЧ-1 в культуре СЕМ-SS клеток с EC_{50} 0.015 мкМ, а также ингибировало активность РНКазы Н ОТ с IC_{50} 0.005 мкМ и активность IN с IC_{50} 0.021 мкМ. Также обнаружено, что соединение способно блокировать репликацию вариантов ВИЧ-1, резистентных к действию релтегавира[160].

1.6.4. Синтез производных урацила с двойной активностью в отношении ВИЧ.

Синтез соединения **143** включал 3 стадии (схема 29). Триметилсилил-производное 5-изопропил-6-(3,5-диметилбензил)урацила **150** конденсировали с хлорэфиром **151** в метиленхлориде при комнатной температуре в присутствии тетрабутиламмоний иодида что вело к образованию кетона **152**, выход которого составил 76%. Конденсация кетона **152** с диэтилоксалатом привела к кетозэфиру, который гидролизовали водно-спиртовым раствором NaOH в хлористом метиле с получением продукта **143** (см. схему 29)[150].

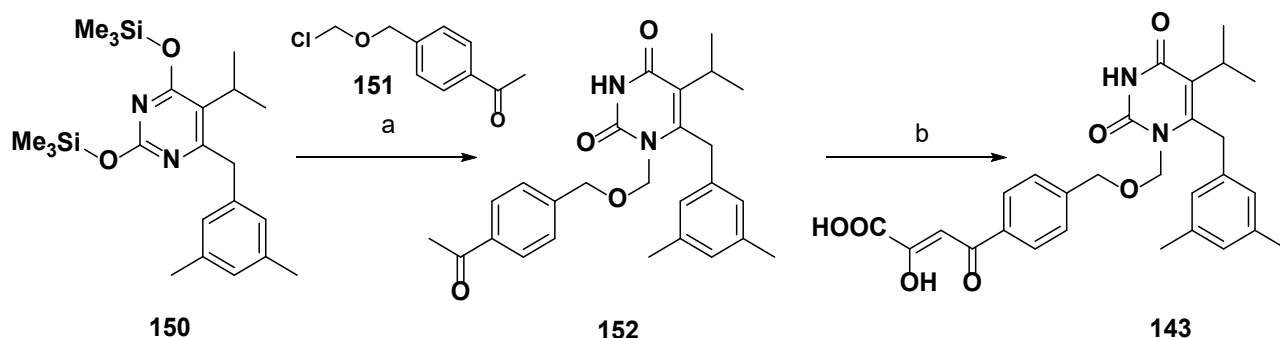
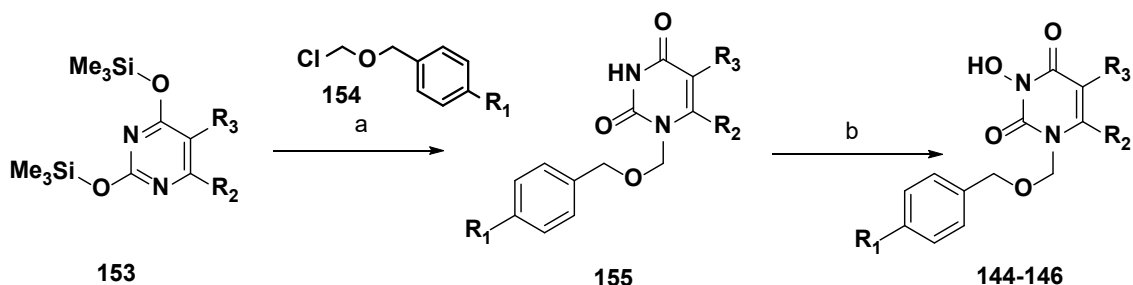


Схема 29. Условия и реагенты: а) **151**, йодид тетрабутиламмония, CH_2Cl_2 , rt, 76%; б) (i) диэтилоксалат, (ii) NaOH (1 N), EtOH/ CH_2Cl_2 , 79%.

Синтез целевых соединений **144** – **146** (схема 30) начинали с конденсации соответствующих производных 2,4-бистриметилсилилурацила **153** и бензилоксиметилхлорида **154** в хлористом метиле при комнатной температуре в присутствии тетрабутиламмоний иодида, что вело к образованию 1-бензилоксиметил-производных **155** с выходом 83-87%. Последующее N^3 -гидроксилирование посредством окисления *m*-CPBA в присутствии гидрида натрия приводило к получению целевых соединений **144** – **146**, выход которых был в пределах 53-70%[151-155].



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{F}$; $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{Ph}, \text{CO}(3,5\text{-Me}_2\text{C}_6\text{H}_3)$, циклогексилметил; $\text{R}_3 = \text{Et}, i\text{-Pr}$.

Схема 30. Условия и реагенты: а) **154**, тетрабутиламмоний иодид, CH_2Cl_2 , rt, 51-89%; б) NaH, *m*-CPBA, ТГФ, rt, 50-73%.

Синтез N^3 -гидроксиурацила **147**, содержащего в положении 6 диарильный фрагмент представлен на схеме 31. 3-Бензилокси-6-хлорурацил конденсировали с 4-фениланилином в растворе ДМФА в присутствии *N,N*-диметиланилина при 170°C, что привело к образованию к 4-фенилфениламино-производного **156** с выходом 54-85%. Дебензилирование проводили в растворе метанола в присутствии Pd/C в атмосфере H_2 , выход целевого соединения **147** составил 82–90%[156].

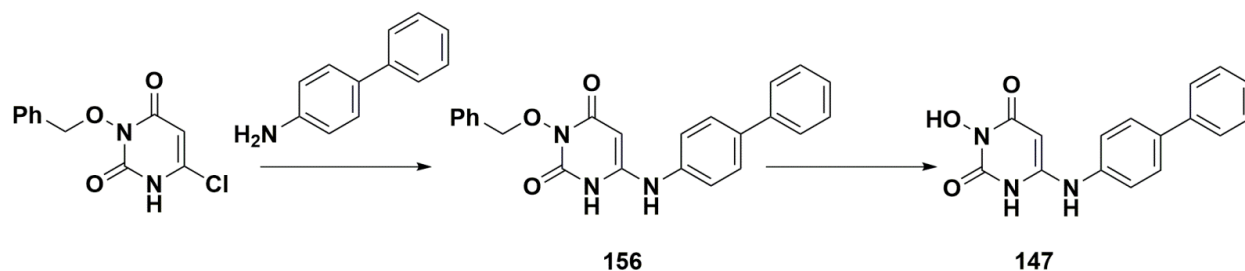


Схема 31. Условия и реагенты: а) ДМФА, *N,N*-диметиланилин, 170°C, микроволновая печь, 30–40 мин; б) Pd/C, H_2 , MeOH, 3–4 ч.

Синтез 3-гидрокси-6-[[3'-метокси-(1,10-бифенил)-4-ил]сульфанил]урацила **148** представлен на схеме 32. 3-Бензилокси-6-(4-бромфенилсульфанил)урацил **157**, полученный в соответствии с известным методом[161], конденсировали в условиях реакции Судзуки с 3-метоксифенилборной кислотой в присутствии катализатора $Pd(PPh_3)_4$. При этом образовывалось 3-метоксифенил-производное **158**, которое обрабатывали TFA в микроволновой печи и получали продукт **148** с выходом 57%[157].

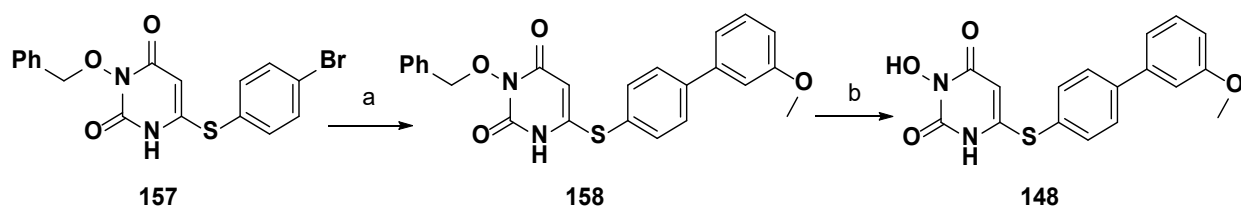


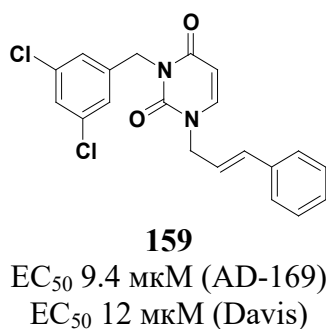
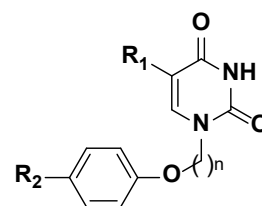
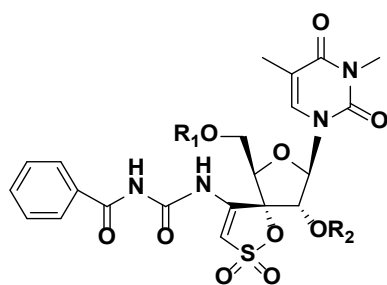
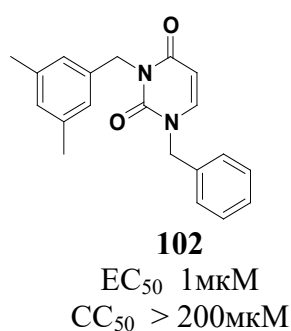
Схема 32. Условия и реагенты: а) арилбороновая кислота, $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , MeOH/ H_2O , микроволновая печь, 120°C, 30-50 мин, 40-79%; б) TFA, микроволновая печь, 120°C, 40-50 мин, 39-90%.

1.7. Производные урацила, как ненуклеозидные ингибиторы репликации различных вирусов

1.7.1. Ингибиторы цитомегаловируса человека (HCMV)

Цитомегаловирус человека (HCMV) является представителем подсемейства *Betaherpesvirinae*; он встречается почти у 90% взрослого населения[162]. Вирус никак не проявляется в здоровом организме, но может быть смертельным для людей с ослабленной иммунной системой: ВИЧ-инфицированных, реципиентов трансплантата, новорожденных[162]. HCMV является наиболее частой причиной врожденных вирусных инфекций у новорожденных[163], он способен проникать через плаценту и инфицировать плод, приводя к мертворождению и врожденным деформациям[164].

Маруяма с соавторами обнаружили, что некоторые 1,3-дизамещенные производные урацила помимо анти-ВИЧ активности проявляют активность и в отношении HCMV[120]. Наибольшую анти-HCMV активность, среди ННИОТ ВИЧ-1 данного типа, продемонстрировало производное **102**, которое подавляло репликацию вируса (штамм AD-169) в концентрации EC_{50} 1.0 мкМ (рис. 24). Другие 1,3-дизамещенные производные урацила имеют существенно меньшую активность или вовсе неактивны в отношении HCMV[120]. Еще одним примером 1,3-дизамещенного урацила с заметной активностью в отношении HCMV является 1-циннамил-3-(3,5-дихлорбензил)урацил **159** (рис. 24)[126]. Синтез соединения **102** и аналогов соединения **159** описан выше (см раздел 3.2.)



160: $R_1 = R_2 = \text{TBDMS}$;
161: $R_1 = \text{TDS}$, $R_2 = \text{TBDMS}$;
162: $R_1 = R_2 = \text{TDS}$
160: EC_{50} 1.1 мкМ (AD-169)
160: EC_{50} 1.4 мкМ (Davis)
160: $CC_{50} > 200\text{мкМ}$

163: $n = 5$, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CN}$
164: $n = 5$, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$
165: $n = 5$, $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{Br}$
166: $n = 8$, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$
 EC_{50} 5.5–12 μM (AD-169)
 EC_{50} 5.5–12 μM (Davis)
 $CC_{50} \geq 100\mu\text{M}$

Рисунок 24. Структуры и свойства соединений **102**, **159-166**

3-Бензоилуреидо-замещенный аналог **160**, является производным соединения **130** [1-[2',5'-бис-*O*-(*трет*-бутилдиметилсилил)- β -D-рибофуранозил]-3-*N*-(метил)тимин]-3'-спиро-5''-[4''-(3-бензоилуреидо)-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксид], проявившего себя как эффективный ННИОТ ВИЧ.[165] В отличие от производных TSAO-T **129-134**, описанных выше, соединение **160** не обладает существенной анти-ВИЧ активностью, однако способно ингибировать HCMV при концентрациях в нижнем диапазоне мкМ (EC_{50} 1.4 мкМ (Davis), 1.1 мкМ (AD-169)) при отсутствии цитотоксичности в эмбриональных клетках легких человека (HEL) (CC_{50} >200 мкМ). Родственные соединения, в которых одна из *трет*-бутилдиметилсилильных групп (**161**) или они обе (**162**) заменены на TDS (тексилдиметилсилил) проявляют сходную анти-HCMV активность: в культуре клеток HEL (EC_{50} 1.4 -1.5 мкМ (Davis), 1.1-1.2 мкМ (AD-169), но более токсичны CC_{50} >50 мкМ (рис. 24). Замена *трет*-бутилдиметилсилильной группы в 5'-положении молекулы бензоильной также приводила к более высокой цитотоксической при сохранении противовирусной активности. А вот удаление 2'-TBDMS равно как и замена на остаток ацетила или бензила, приводят к полной потере активности[166]. Мутантные по ДНК-полимеразе или вирусной протеинкиназе, отвечающей за фосфорилирование нуклеозидных препаратов, штаммы HCMV оставались полностью чувствительными к ингибирующей активности соединений **161** и **162**. Это указывает на механизм действия, отличный от такового у клинически используемых аналогов нуклеозидов. Производные **161** и **162** также показали высокую активность против цитомегаловируса мыши (MCMV) со значениями EC_{50} 0,66 и 0,54 мкМ, соответственно. Заметно более низкая активность соединений **161** и **162** зафиксирована против вируса ветряной оспы (VZV) (EC_{50} 11-16 мкМ, на штаммах дикого типа и с дефицитом тимидинкиназы), активности в отношении вируса простого герпеса типов 1 и 2, вируса осповакцины и РНК-вирусов не обнаружено.

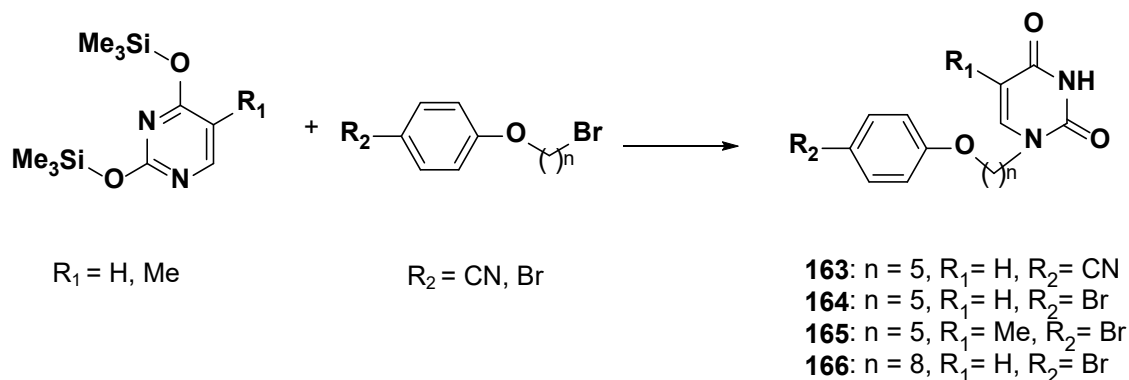


Схема 33. Условия и реагенты: 160-170°C

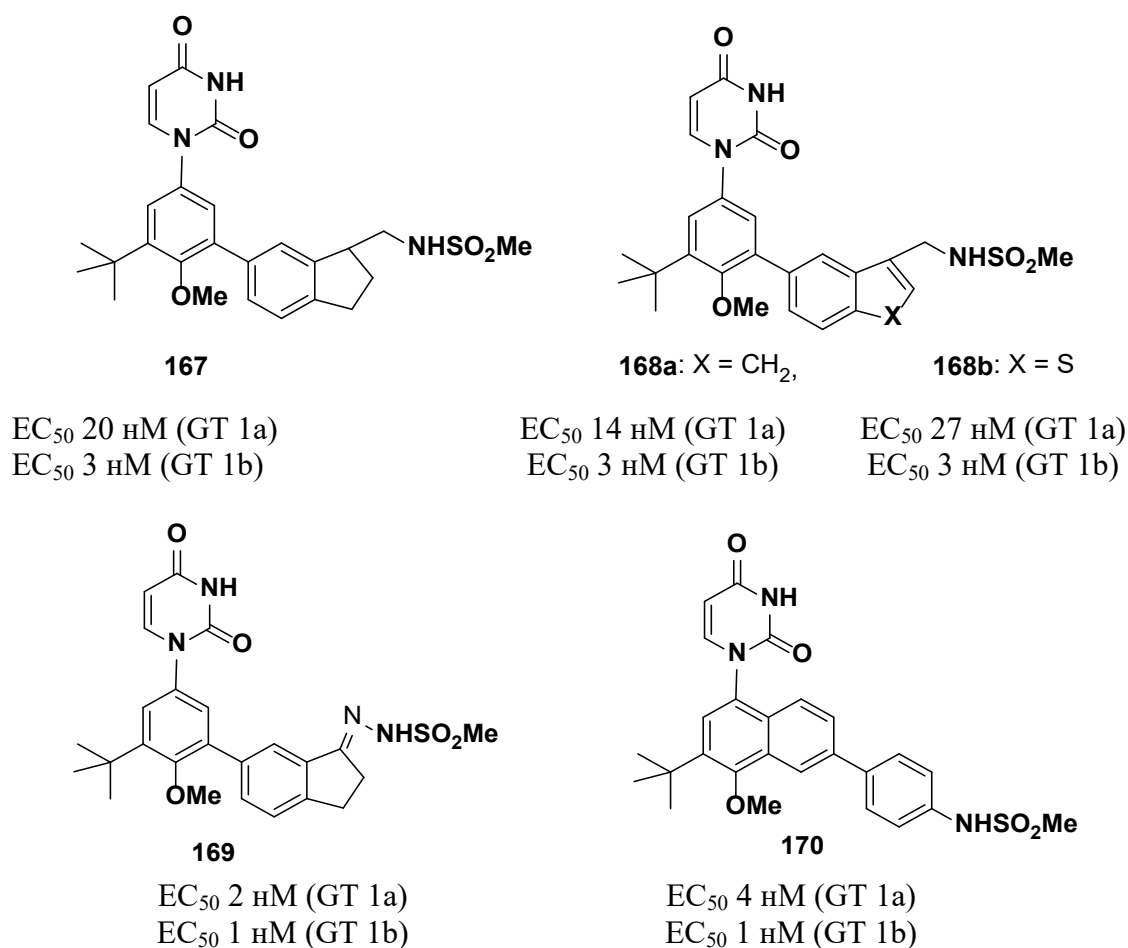
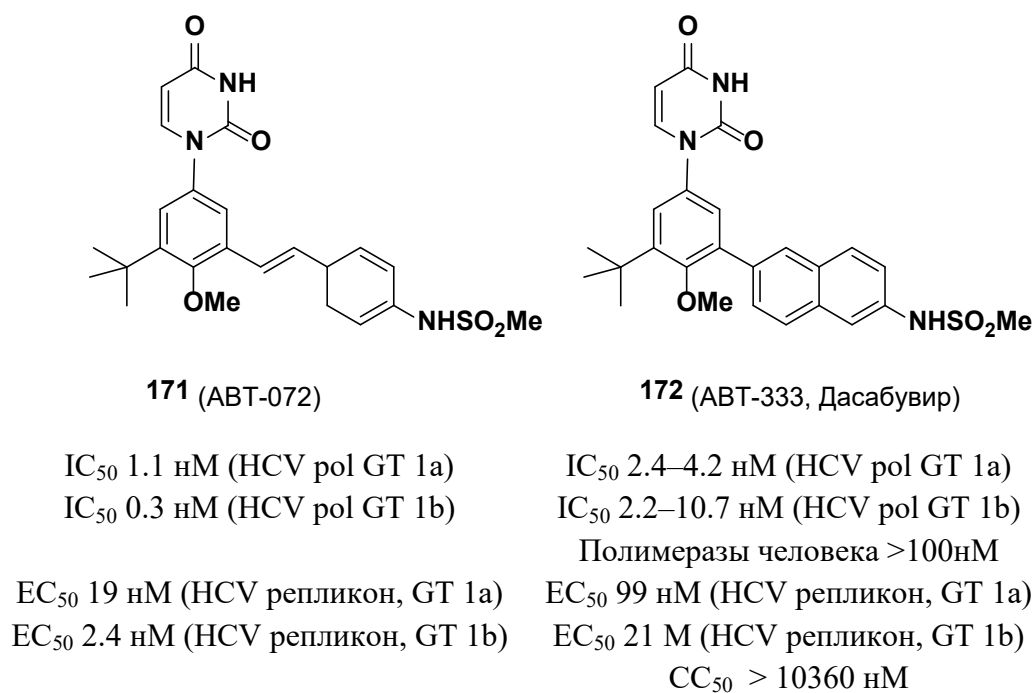
Другой группой соединений с выраженной активностью в отношении HCMV (EC_{50} 5,5–12 мкМ, штаммы Davis и AD-169; $CC_{50} \geq 100$ мкМ, культура клеток HEL) являются производные 1-[ω -(фенокси)алкил]урацила **163-166** (рис. 24)[167]. Данные соединения с выходом 73-88% получают конденсацией эквимольных количеств соответствующих 2,4-бис(триметилсилил)пиримидина и ω -(фенокси)алкил бромида при 160-170°C в отсутствие растворителя (Схема 33)[167].

1.7.2. Ингибиторы вируса гепатита С (HCV)

Вирус гепатита С (HCV) представляет собой (+)-цепочечный РНК-вирус семейства *Flaviviridae*, который впервые был идентифицирован в 1989 г.[168]. Долгосрочное естественное течение инфекции ВГС разнообразно. Поражение печени может варьироваться от минимальных гистологических изменений до обширного фиброза и цирроза с гепатоцеллюлярной карциномой. В настоящее время существует несколько высокоэффективных схем лечения инфекции HCV, которые включают различные комбинации ингибиторов протеазы NS3 и интерферон-устойчивого белка NS5A, нуклеозидных и ненуклеозидных ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы (полимеразы NS5B). Ингибиторы полимеразы NS5B HCV являются одними из наиболее клинически полезных агентов для лечения инфекции HCV. Ингибиторы нуклеозидов связываются с каталитическим сайтом NS5B в качестве своих трифосфатных метаболитов и действуют, прерывая передачу генетической информации как терминаторы цепи РНК. Ненуклеозидные ингибиторы (НИИ) связываются с одним из четырех аллостерических сайтов в NS5B и нарушают каталитическую функцию фермента, влияя на его конформацию[169].

Серия аналогов N1-арилурацила **167-170** была описана[170, 171] как новый структурный класс ненуклеозидных ингибиторов полимеразы NS5B HCV с селективной активностью (EC_{50} 1-27 нМ, репликон HCV), ограниченной генотипами 1a и 1b (рис. 25).

171 (ABT-075) [169] и **172** (Дасабувир, ABT-333) [172] (рис. 26) являются родственными соединениями, их доклинические исследования также показали высокую противовирусную активность в инфицированных культурах клеток и тканях[169, 172-174]. Результаты исследования фармакокинетических параметров на крысах, собаках и кроликах, а также отсутствие острой и хронической токсичности для лабораторных животных, позволили рекомендовать оба соединения, **171** и **172**, для клинических испытаний[169, 175].

Рисунок 25. Структуры и свойства соединений **167-170**Рисунок 26. Структуры и свойства соединений **171-172**

Клинические испытания подтвердили эффективность дасабувира (**172**) в лечении хронического HCV генотипов 1a и 1b. Этот препарат считается безопасным и не вызывает серьезных побочных эффектов. Доказано, что дасабувир обладает синергизмом в комбинированной терапии с другими препаратами, несмотря на то, что при использовании в качестве монотерапевтического агента он демонстрирует умеренную противовирусную эффективность. В настоящее время дасабувир лицензирован, его назначают в дозе 250 мг два раза в день в сочетании с паритапревиром / ритонавиром, омбитасвиром и рибавирином[176]. Эта комбинация препаратов наряду с высокой активностью демонстрирует приемлемый профиль безопасности и хорошо переносится пациентами, что поддерживает приверженность лечению и замедляет возникновение резистентности[176].

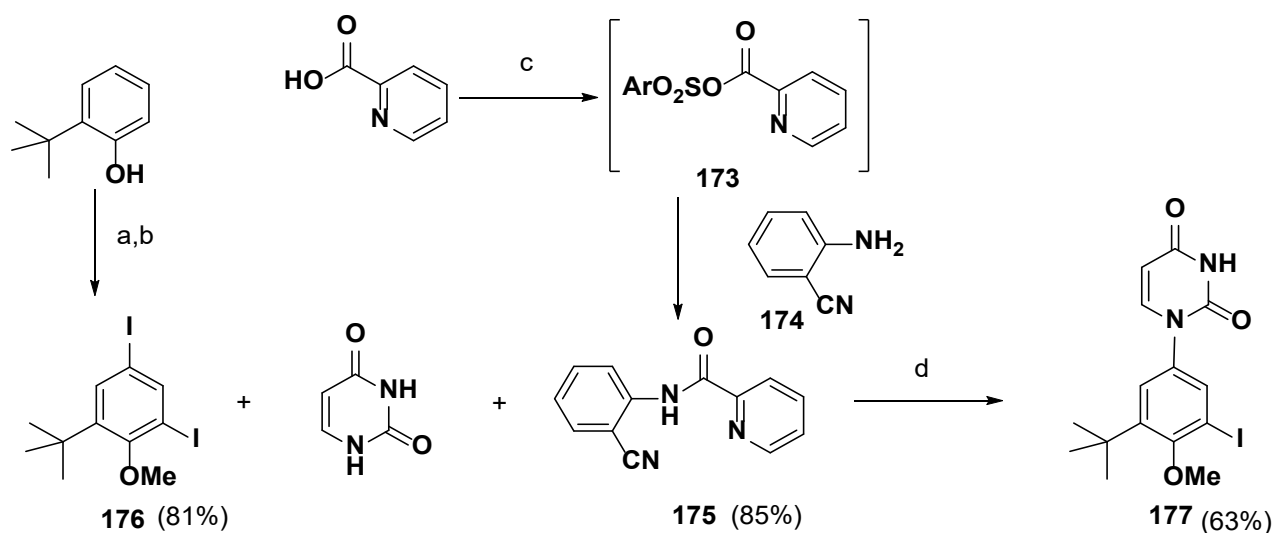


Схема 34. Условия и реагенты: а) NaI, NaOCl, MeOH, H₂O; б) NaOH, MeI, ацетон; с) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; д) CuI, K₃PO₄, ДМСО, 60°C, водная обработка, кристаллизация из *i*-PrOAc/гептан, перекристаллизация из *i*-PrOH

Современный метод синтеза дасабувира[177] представлен на схемах 34 и 35. Реакция пиколиновой кислоты с толуолсульфонилхлоридом (схема 34) приводит к смешанному ангидриду **173**, который *in situ* реагирует с антралилонитрилом **174**, давая лиганд **175** с выходом 85%. Обработка 2-*tert*-бутилфенола йодидом натрия и гипохлоритом натрия и последующее метилирование (NaOH, MeI, ацетон) приводят к образованию дийоданизола **176** с высоким выходом. Реакция урацила с дийоданизолом **176** в присутствии йодида меди и лиганда **175** в ДМСО протекает с получением N¹-замещенного урацила **177**. Присутствие 70 мол.% воды по отношению к **176** не оказывает существенного влияния на выход продукта **177**. Оптимальные условия реакции включают

использование в качестве основания порошкообразного фосфата калия, 10 мол.% йодида меди (I) и 12 мол.% лиганда **175** (схема 34). Реакционную смесь промывают водой для удаления $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ и выделяют продукт **177** кристаллизацией из *i*-PrOAc / гептана. Перекристаллизация из 2-пропанола позволяет получить продукт с чистотой >97.8%. Выход промежуточного продукта **177** в масштабированном до сотен килограмм синтезе составляет 63-64% в расчете на исходный 2-*трет*-бутилфенол (схема 34).

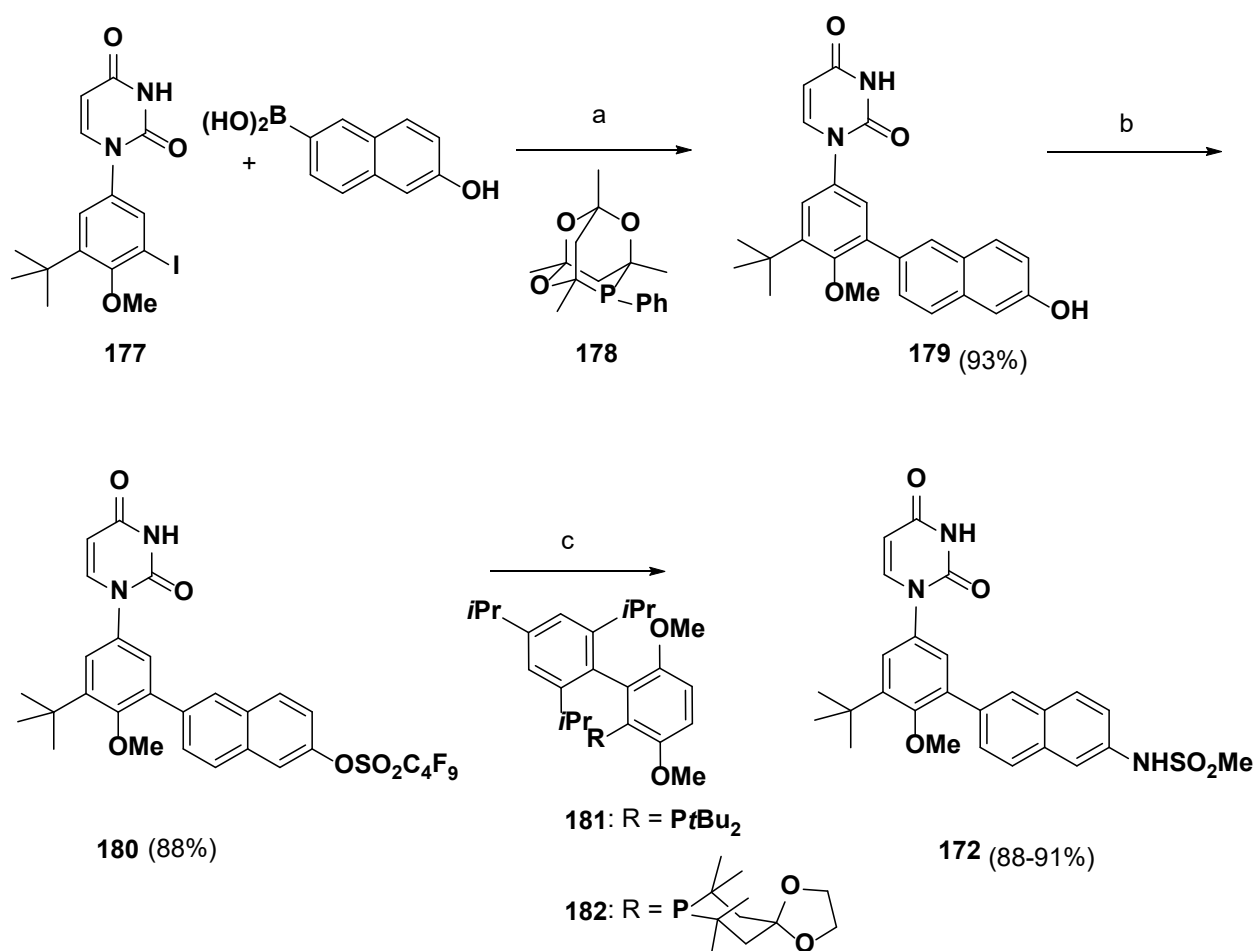
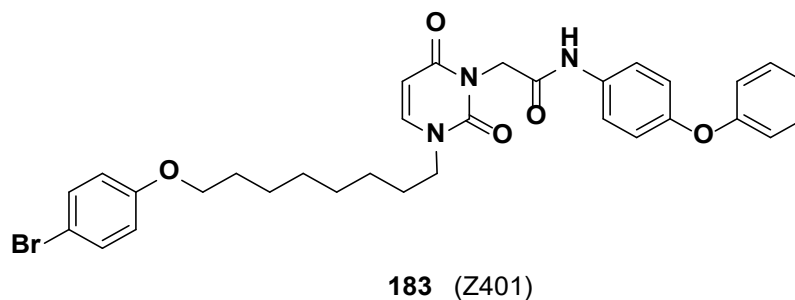


Схема 35. Условия и реагенты: а) Pd_2dba_3 , **173**, K_3PO_4 , ТГФ/ H_2O , 60-65°C; б) $\text{FSO}_2\text{C}_4\text{F}_9$, K_2CO_3 , MeCN/ДМФА, 30°C; в) $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{CH}_3$, Pd_2dba_3 , K_3PO_4 , этилацетат, 90°C, **181** или **182**

Реакция кросс-сочетания Сузуки N^1 -замещенного урацила **177** с гидроксинафтилбороновой кислотой в присутствии Pd_2dba_3 и лиганда **178** приводит к образованию нафтола **179** (Схема 35). Реакция достигает полной конверсии за 1,5 ч, обеспечивая высокий выход нафтола **179** с чистотой > 90%. Получение нонафлата **180** из нафтола **179** проводят под действием перфторбутансульфонилфторида в присутствии поташа в смеси растворителей ДМФА / MeCN. Финальная реакция сульфонамидирования,

катализируемая Pd с использованием лигандов **181** (*t*-Bu-BrettPhos) или **182** (VincePhos) со сравнимой эффективностью дает 90% дасабувира (**172**) с чистотой > 99,5%. (Схема 35)

Еще одним урацил-содержащим ингибитором HCV является производное **183** (Z401, рис. 27). Это соединение было получено в числе прочих N^1, N^3 -замещенных урацилов и на клетках Huh7-J20, инфицированных HCV, показало лучшее в ряду соотношение антивирусной активности (IC_{50} 0.092 мкМ) и цитотоксичности (CC_{50} 22.6 мкМ) с индексом селективности превышающим 244[178]. Показано, что соединение **178** блокирует репликацию различных генотипов HCV, 1b, 2a и 3a на ранних стадиях, со значениями IC_{50} 2.2, 0.092 и 0.69 мкМ соответственно.



IC_{50} 0.092 мкМ; CC_{50} 22.6 мкМ

Рисунок 27. Структура и свойства соединения **183**

1.7.3 Ингибиторы вируса гепатита В (HBV)

Приблизительно 400 миллионов человек во всем мире хронически инфицированы вирусом гепатита В (HBV), заболеванием, которое может привести к циррозу, гепатоцеллюлярной карциноме и смерти[179-181]. Текущие варианты лечения HBV включают только определенные нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) и модулятор врожденного иммунитета, интерферон альфа. Интерферон имеет ограниченную эффективность у пациентов и имеет множество побочных эффектов. НИОТ могут эффективно контролировать размножение вируса и прогресс заболевания, но не избавляют от инфекции. Соответственно, инфицированным HBV людям в настоящее время требуется пожизненное лечение, которое является дорогостоящим и вызывает побочные эффекты из-за длительного приема лекарств[181, 182].

РНКазы Н вируса гепатита В (HBV) является привлекательной терапевтической мишенью из-за ее важной роли в репликации вируса. Ингибиторы РНКазы Н могут помочь более эффективно контролировать инфекции HBV. В культуре клеток HepAD38 были протестированы 52 соединения, которые ингибируют активность РНН HBV в

инфицированных клетках. Два наиболее активных из этих соединений **184** и **185** (рис. 28) ингибировали репликацию HBV в микромолярном диапазоне[183].

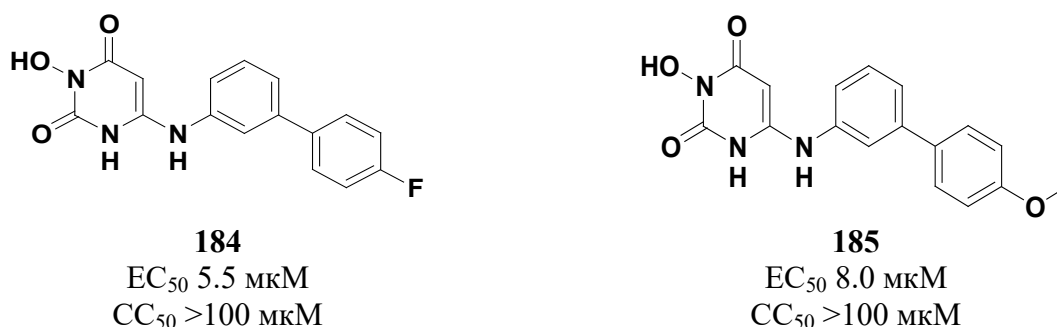
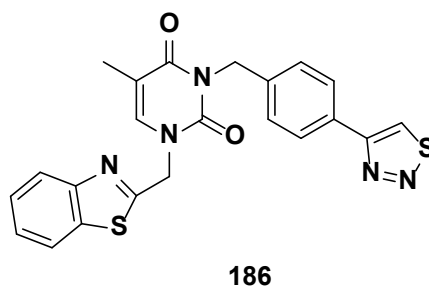


Рисунок 28. Структуры и свойства соединений **184-185**

1.7.4. Ингибиторы респираторно-синцитиального вируса (RSV)

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) - основная причина инфекций нижних дыхательных путей, эффективное лечение которых пока недоступно. Поиск новых ингибиторов RSV - важный первый шаг на пути к разработке эффективной терапии RSV. Соединение **186** (рис. 29) представляет собой ненуклеозидный ингибитор полимеразы RSV[168], со структурой, отличной от ранее описанных серий YM-53403 / AZ-27 и BI [184-186], однако вероятно, имеет аналогичный механизм действия[187]. Ингибитор **186** идентифицирован в процессе скрининга 1 миллиона соединений из коллекции AstraZeneca на репликоне RSV, он селективно действует на RSV и не активен против других вирусов. Отбор резистентных к **186** штаммов RSV позволил идентифицировать мутации в РНК-зависимой РНК-полимеразе (Y1631C и I1413T). Рекомбинантный RSV, содержащий замену Y1631C, был устойчив к действию соединения **186**, позволяя предположить, что именно полимеразы RSV являются мишенью этого ингибитора[168].

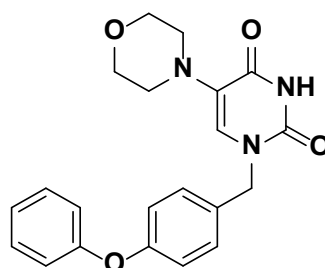


EC₅₀ 1.6 мкМ (RVS (A2) в клетках HEp2); CC₅₀ >100 мкМ (HEp2)

Рисунок 29. Структура и свойства соединения **186**

1.7.5. Ингибиторы аденовируса человека (HAdV)

Аденовирусы человека (HAdV) лишены оболочки, их геном представляет собой линейную несегментированную двухцепочечную ДНК[188]. Аденовирусные инфекции широко распространены и очень заразны, чаще всего они поражают слизистые оболочки дыхательных путей, глаз, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы[189-194]. У людей с ослабленным иммунитетом аденовирусные инфекции могут приводить к развитию острых заболеваний, приводящих к смерти[195]. На данный момент не существует специфических эффективных лекарств против аденовирусных инфекций.



187

EC₅₀ 0.5 мкМ
CC₅₀ 47.6 мкМ

Рисунок 30. Структура и свойства соединения **187**

В результате скрининга ряда 5-амино-производных 1-замещенных урацила в культуре HEK293 клеток было обнаружено, что 1-[4-(фенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил **187** (рис. 30) ингибирует репликацию рекомбинантного аденовируса (штамм HAdV5-eGFP) в концентрации EC₅₀ 0.5 мкМ и проявляет цитотоксичность в концентрации 47.6 мкМ. Оценка влияния соединения **187** на инфекционность аденовирусного потомства HAdV5-eGFP показала снижение его титра. На основании этого можно сделать предположение, что механизм действия **187** связан с ингибированием ключевых факторов репликации аденовирусов человека, таких, как вирусная ДНК-полимераза и продукты гена E1A[194].

1.7.6. Ингибиторы SARS-CoV-2

Пандемия COVID-19, вызванная β-коронавирусом SARS-CoV-2, за первые 1,5 года унесла жизни около 4 миллионов человек[196]. Несмотря на разработку и использование

вакцин против COVID-19, это заболевание останется главной глобальной проблемой общественного здравоохранения в 2021 году. В рамках перепрофилирования существующих лекарств с целью создания эффективного лечебного средства ведутся интенсивные исследования лекарств, одобренных для лечения других вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний.

Типирацил (**188**) в комбинации с трифлуридином одобрен FDA для лечения колоректального рака[197]. Он ингибирует тимидинфосфорилазу, фермент который метаболизирует трифлуридин. Было показано, что, **188** (рис. 31) также ингибирует активность эндорибонуклеазы Nsp15 NendoU из SARS-CoV-2[198]. Этот фермент является высококонсервативным в коронавирусах и представляет собой уридин-специфичную эндорибонуклеазу с C-концевым каталитическим доменом, принадлежащим к семейству EndoU. Типирацил (**188**) ингибирует Nsp15, взаимодействуя с уридин-связывающим карманом в активном центре фермента, что подтверждается кристаллографией. Реакция, катализируемая эндорибонуклеазой SARS-CoV-2 Nsp15, снижается на 50% в присутствии 7,5 мкМ соединения **188**. Был проведен ELISA-анализ S-антигена в клетках A549 и анализ репликации вируса CoV-2 с использованием qRT-PCR. Типирацил не влиял на жизнеспособность клеток, но ингибировал вирус в диапазоне концентраций 1-50 мкМ. Активность типирацила недостаточно высока для эффективного лекарственного средства, но это многообещающее соединение-лидер для разработки новых высокоактивных ингибиторов вирусной пролиферации[198].

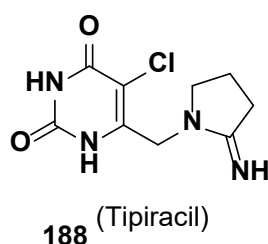
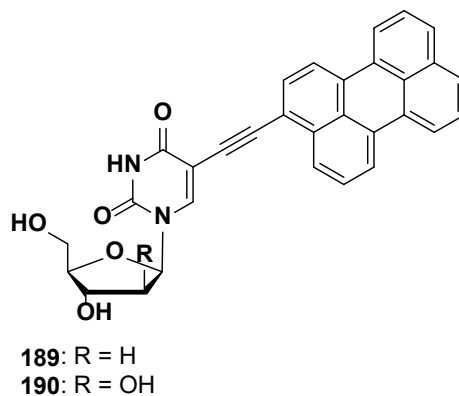


Рисунок 31. Структура соединения **188**

Кроме того, виртуальный скрининг препаратов, одобренных FDA США, с помощью компьютерных инструментов привел к идентификации Типирацила (**188**) среди других потенциальных ингибиторов основной протеазы SARS-CoV-2 (M^{pro})[199].

1.7.7. Жесткие амфипатические ингибиторы слияния: HCV, HSV-1, HSV-2, TBEV (Вирус клещевого энцефалита) и др. вирусы

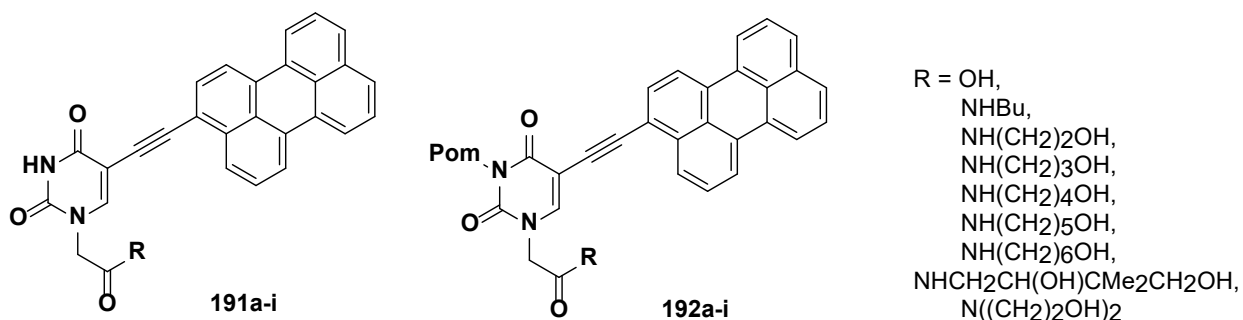
Жесткие амфипатические ингибиторы слияния **189-192** являются мощными противовирусными препаратами[200-203]. Они представляют собой синтетические амфифильные молекулы на основе периленового ядра, связанного с нуклеозидами, и их форма аналогична форме фосфолипидов. RAFI **189** и **190** (рис. 32) подавляют инфекционность нескольких неродственных оболочечных вирусов[201, 204] без цитотоксических или цитостатических эффектов ($SI > 3000$)[202]. Механизм действия RAFI является биофизическим. Они взаимодействуют с липидами оболочки вириона и предотвращают слияние вирусной и клеточной мембран, препятствуя формированию увеличенной отрицательной кривизны, необходимой для начальных стадий слияния.



| Вирус | 189 | 190 |
|--|------------------------|------------------------|
| | IC ₅₀ , мкМ | IC ₅₀ , мкМ |
| Грипп (A/PR/8/34, A/USSR/90/77, A/Aichi/2/68, A/PC/1/73) | 0.097-0.187 | 0.078-0.283 |
| HCV (JFH-1) | 0.107 | 0.187 |
| VSV | 0.002 | 0.005 |
| HSV-1 (KOS) | 0.048 | 0.131 |
| HSV-2 (186) | 0.052 | 0.031 |
| mCMV | 0.013 | 0.037 |
| TBEV [204] | 0.024 | 0.018 |

Рисунок 32. Структуры и свойства соединений **189-190**

Не содержащие углеводного фрагмента, 5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусная кислота **191a** и ее амиды **191b-i** (рис. 33) обладают низкой токсичностью для клеток почек свиного эмбриона (РЕК) и высокой активностью в отношении вируса клещевого энцефалита (TBEV). Оказалось, что синтетические предшественники **191a-i** защищенные 3-пивалоилоксиметиллом (Pom) **192a-i** (рис. 33), проявили еще более выраженную активность[203].



EC₅₀ 0.003-0.05 μM (TBEV strain Absettarov) EC₅₀ 0.0004-0.05 μM (TBEV strain Absettarov)
CC₅₀ >50 μM (PEK cells) CC₅₀ >50 μM (PEK cells)

Рисунок 33. Структуры и свойства соединений **191-192**

1.8. Димеры ННИОТ и НИОТ

Существует несколько аргументов в пользу создания гетеродимеров НИОТ-ННИОТ. Использование НИОТ и ННИОТ в комбинированной терапии подтверждает гипотезу о том, что синергетическая активность препаратов приводит к большей эффективности и замедляет возникновение устойчивости к отдельным агентам[205]. Кооперативное взаимодействие между карманом связывания ННИОТ и сайтом связывания субстрата позволяет предположить, что гетеродимер, сочетающий функции ННИОТ и НИОТ, может очень прочно и специфично связываться с ОТ ВИЧ[206]. Расчеты аддитивности энергий связывания для многокомпонентных систем показывают, что сродство ОТ к молекуле гетеродимера может быть больше, чем для отдельных компонентов[207]. Эти доводы привели к появлению альтернативного подхода к комбинированной терапии с использованием «ингибиторов смешанного сайта», то есть гетеродимерных молекул, которые связываются одновременно в обеих областях ОТ.

Путем объединения нуклеозидного и нуклеозидного ингибиторов ОТ ВИЧ в одной молекуле, были получены разные типы гетеродимеров. Первый тип содержит TSAO-T и AZT **193** или d₄T **194** (рис. 34), связанные по положениям N³ гетероциклических оснований алкильным линкером[208, 209]. Димеры данного типа обладают активностью в отношении ВИЧ-1, однако уступают в ней исходным ингибиторам. Кроме того, эти димерные производные неэффективны против ВИЧ-2, что указывает на их чрезмерную стабильность и неспособность высвобождать НИОТ ВИЧ снаружи и внутри клеток. Противовирусная активность димеров может быть приписана части молекулы TSAO-T без какого-либо значительного вклада нуклеозидной части (AZT или d₄T).

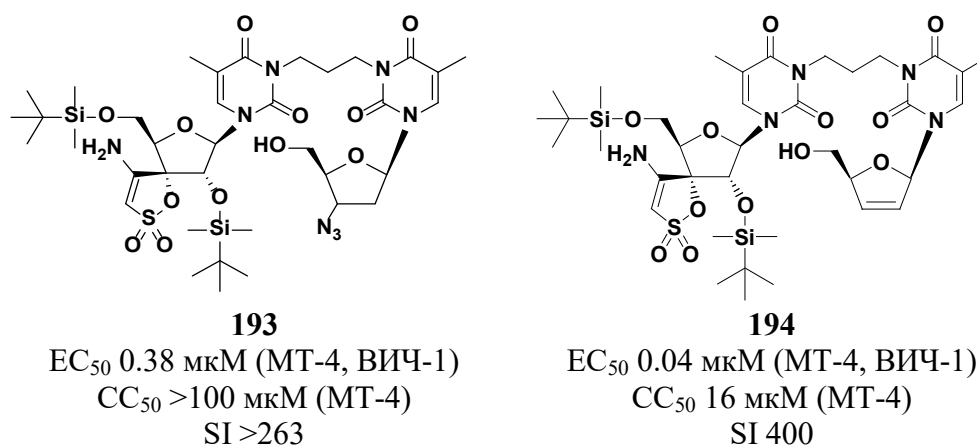
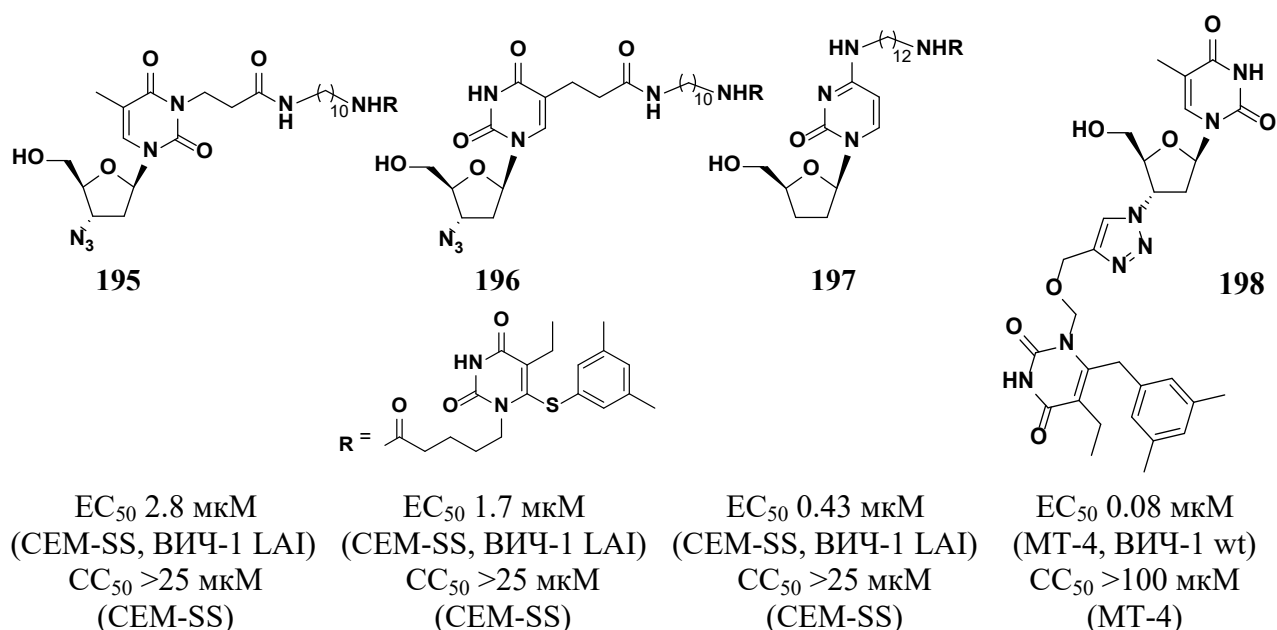
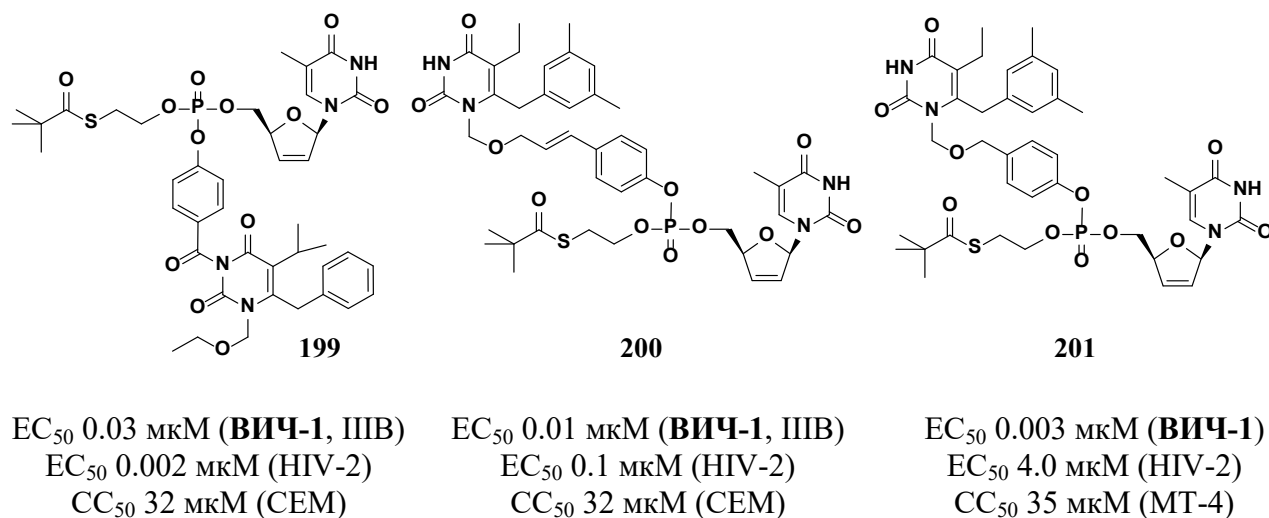


Рисунок 34. Структуры и свойства соединений **193-194**

Другой тип димеров состоит из производного НЕРТ, в качестве ННИОТ фрагмента, и нуклеозидного аналога: AZT, ddC или d₄T[210]. Авторы исследовали зависимость активности от природы линкера и положения его прикрепления в пиримидиновом основании нуклеозидного аналога. Димеры AZT-НЕРТ **195** (с N3 присоединением линкера) и **196** (с C5 присоединением линкера) (рис. 35) проявляют умеренную анти-ВИЧ-1 активность на разных культурах клеток, но не влияют на репликацию ВИЧ-2 или штамма ВИЧ-1 с мутацией Y181C. Молекула ddC-НЕРТ **197** (рис. 35) одинаково эффективна против ВИЧ-1 (штамм дикого типа и устойчивый к невирапину 181C) и ВИЧ-2 в культуре клеток. Отсутствие синергетического эффекта позволяет предположить, что два отдельных компонента димера не связываются одновременно в своих соответствующих сайтах. Интересно, что димеры AZT-НЕРТ (**195** и **196**) и ddC-НЕРТ **197** ингибируют обратную транскриптазу (ОТ) противоположным образом. Авторы предполагают, что соединения **195** и **196** преимущественно взаимодействуют с гидрофобным карманом ОТ, тогда как **197** (после предполагаемого трифосфорилирования) ингибирует ОТ через связывание в каталитическом сайте[210]. Очевидных преимуществ димеров данного типа по сравнению с входящими в их состав индивидуальными ингибиторами, как и в случае соединения **198**, в котором фрагмент ННИОТ (аналог МКС-442) присоединен к 3'-азидо группе AZT методом "click" химии[211], не выявлено. Детальные исследования структуры ОТ ВИЧ показали, что, хотя расстояние между каталитическим сайтом и гидрофобным связывающим карманом относительно невелико (10-15 Å)[212], эти два сайта различны и вероятность того, что молекула гетеродимера сможет связаться с обоими, крайне мала. Это привело к падению интереса к негидролизуемым гетеродимерам.

Рисунок 35. Структуры и свойства соединений **195-198**

С развитием стратегии создания депо-форм и пролекарств, появилась идея со-лекарств («co-drugs»), димеров, способных высвобождать два активных компонента, ингибирующих ВИЧ посредством разных механизмов. Такие гетеродимеры представляют собой пролекарство, обеспечивающее определенные преимущества, например, улучшение растворимости, постепенное высвобождение активных компонентов, приводящее к уменьшению токсичности, улучшение фармакокинетических параметров и замедление возникновения резистентности. Примерами удачной реализации данного подхода являются соединения **199-201** (рис. 36)[213].

Рисунок 36. Структуры и свойства соединений **199-201**

В соединениях **199-201** монофосфат нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы d₄T содержит в качестве фосфоэфирных групп *S*-ацил-2-тиоэтил (SATE) и ароматический линкер, через который присоединен ННИОТ ВИЧ. Димер **199** представляет собой гибрид монофосфата d₄T и известного ННИОТ МКС-442 (**26**, см рис. 7, раздел **1.2.1.**), присоединенного по положению N-3 расщепляемой п-гидроксibenзоильной защитной группой. В димерах **200** и **201** нуклеозидный и ненуклеозидный фрагменты связаны через фенол, входящий в состав этих ННИОТ в качестве заместителя в положении N-1. Димеры **199-201** обладают хорошей активностью против ВИЧ-1 дикого типа, мутанта Y181C, а также против штамма ВИЧ-2, устойчивого к ННИОТ, в культурах клеток MT-4, СЕМ и СЕМ ТК⁺, что подтверждает их способность высвобождать монофосфат d₄T внутри клеток[213].

Гетеродимеры **202a-f** и **203**[214] (рис. 37) включают AZT или 3ТС, в качестве стандартных НИОТ ВИЧ-1, и производные 1-[ω-(фенокси)алкил]урацила[167] (**164**, **166** или родственные им, см рис. 24, секции **6.1.**), являющиеся ненуклеозидными ингибиторами HCMV. Такие гетеродимеры способны высвобождать активные противовирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз). Полученные соединения продемонстрировали противовирусную активность *in vitro* в отношении HCMV (ID₅₀ 3-12 мкМ) и ВИЧ-1 (ID₅₀ 0,19-0,83 мкМ) без цитотоксичности (CD₅₀ 170-600 мкМ в культуре диплоидных фибробластов эмбриона человека, CD₅₀> 100 мкМ на клетках MT-4). Эксперименты на тканевой системе человека *ex vivo*, одновременно инфицированной ВИЧ-1 (LAI.04) и HCMV, подтвердили способность соединений полностью подавлять репликацию обоих вирусов в концентрации 10 мкМ при отсутствии цитотоксичности при этой концентрации[214].

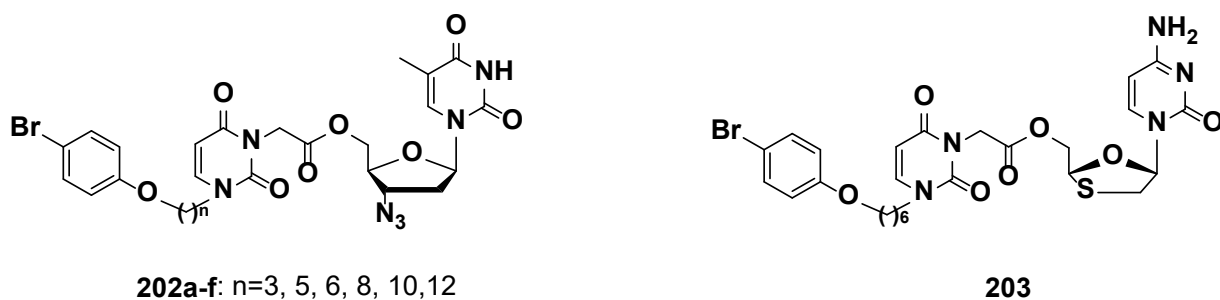


Рисунок 37. Структуры соединений **202-203**

Другими гетеродимерами, содержащими фрагмент уксусной кислоты в качестве связывающего линкера, были соединения **204** и **205**[215]. Они состояли из

ненуклеозидного ингибитора ВИЧ (**66** или родственных соединений) и нуклеозидного ингибитора вирусов герпеса (ацикловира или 5'-нораристеромицина). К сожалению, соединения **204** и **205** не показали никаких преимуществ по сравнению с отдельными активными агентами, которые они включают. Отсутствие значительной противовирусной активности гетеродимеров **204** и **205**[215] (рис. 38) предполагает, что гидролиз линкера и высвобождение аналогов нуклеозидов в условиях клеточного эксперимента происходит слишком медленно, чтобы эффективно доставлять активные компоненты. Таким образом, использование уксусной кислоты в качестве линкера, которое оказалось успешным в ранее изученных и структурно подобных гетеродимерах[214], не дало желаемых результатов для этого типа соединений[215].

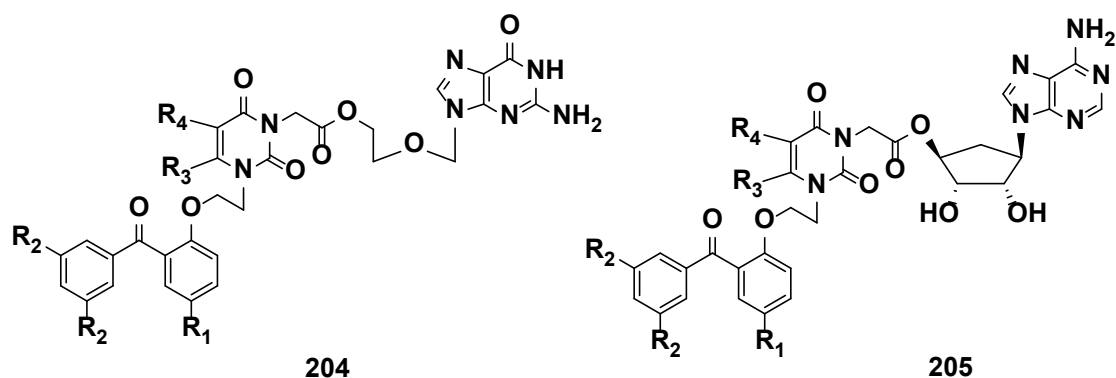


Рисунок 38. Структуры соединений **204-205**

1.9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое применение противовирусных препаратов в XX веке позволило значительно облегчить течение инфекционных заболеваний и снизить смертность. Однако в настоящее время у большинства патогенных вирусов выработалась устойчивость к лекарствам, применяемым в клинике. Кроме того, в последние годы появились новые вирусы, такие как грипп H5N1 и H1N1, SARS, MERS, Эбола и Зика. В настоящее время наблюдается пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2. В связи с этим разработка новых противовирусных средств остается чрезвычайно актуальной задачей. Известно, что значительное внимание исследователей уделяется химии гетероциклических соединений, содержащих атомы азота и производных урацила это одно из наиболее изученных и продуктивных направлений медицинской химии. Производные урацила проявляют широкий спектр биологических активностей, включая противоопухолевую, антибактериальную, противопаразитарную, противовирусную и др. В этом обзоре представлен широкий спектр производных урацила, которые являются ненуклеозидными ингибиторами различных ДНК и РНК содержащих вирусов. Описаны также условия синтеза противовирусных агентов на основе урацила и вопросы, связанные с взаимосвязью структуры и противовирусной активности представленных производных.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов как НИОТ и ННИОТ ВИЧ

Нуклеозидные аналоги, в которых кольцо тетрагидрофурана заменено цикlopентаном, называют карбоциклическими аналогами нуклеозидов[216]. 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 очень 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[2].

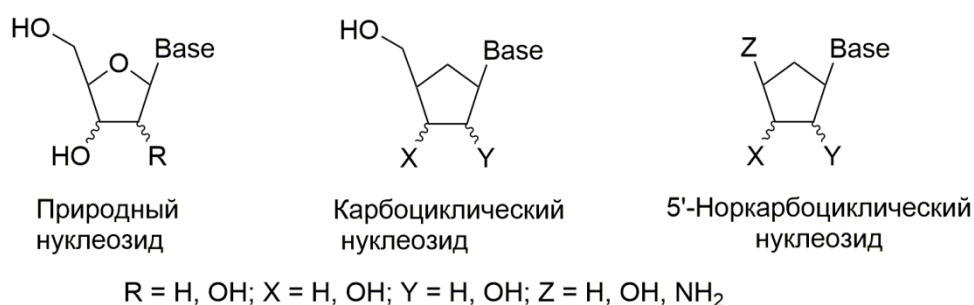


Рисунок 1. Особенности структуры нуклеозидов и их карбоциклических аналогов

Карбоциклические аналоги привлекли внимание исследователей, после того как была продемонстрирована высокая антивирусная активность первых выделенных из природных источников соединений — непланоцина А[217] и аристеромицина[218] (Рис. 2).

Карбоциклические нуклеозидные аналоги были впервые получены синтетическим путем в 1966 году[219]. В 1987-1990 годах группами Борчардта, Шнеллера и Троста были синтезированы карбоциклические аналоги нуклеозидов, не содержащие атома углерода в 5'-положении[220-222]. Такие соединения были названы 5'-норкарбоциклическими нуклеозидами. Причиной для их создания послужила необходимость снизить цитотоксичность аристеромицина и непланоцина А, связанную с субстратными

свойствами их фосфорилированных форм в отношении клеточных ферментов. Отсутствие 5'-метиленового фрагмента приводило к утрате 5'-норкарбоциклическими аналогами непланоцина А и аристеромицина субстратных свойств в отношении клеточных аденозинкиназы и аденозиндеаминазы, вследствие чего понижалась их токсичность[223].

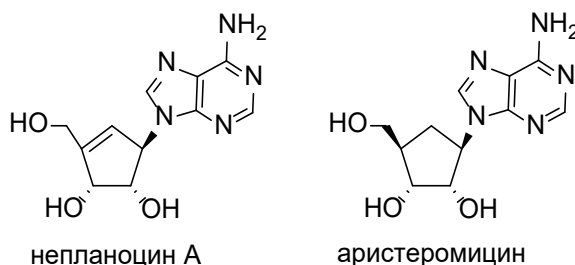


Рисунок 2. Структуры карбоциклических аналогов аденозина

За последние десятилетия появилось большое число публикаций, описывающих синтез и биологическую активность различных 5'-норкарбоциклических нуклеозидов[1, 224]. Многие из них проявляют широкий спектр антивирусной активности и обладают большей устойчивостью в культурах клеток и значительно меньшей цитотоксичностью, чем истинные нуклеозиды и их соответствующие карбоциклические аналоги.

Такая структурная особенность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов, как отсутствие 5'-метиленовой группы и, как следствие, невозможность превращаться в фосфорилированные формы под действием клеточных ферментов, полезна 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.

В данном разделе 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.

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

2.1.1.1 Синтез 5'-норкарбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов

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

Ранее в нашей лаборатории 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[225]. 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 данной части работы представлен синтез карбонуклеозидтри- и тетрафосфонатов и исследование их свойств в качестве терминаторных субстратов ОТ ВИЧ, а также их антивирусной активности в клеточных культурах, инфицированных ВИЧ.

Ключевыми соединениями для синтеза карбоциклических динуклеозидолигофосфонатов служили фосфонаты карбоциклических аналогов пуриновых нуклеозидов. Они были получены из эпоксициклопентена **1**, который является удобным предшественником в синтезе рацемических карбоаналогов нуклеозидов[226].

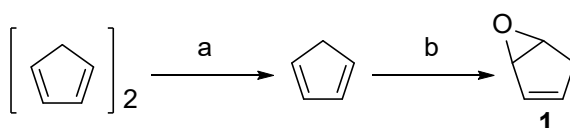


Схема 1. (a) 230°C; (b) CH₃COOH

Исходный дициклопентадиен пиролизом переводили в мономерную форму, которую избирательно окисляли по одной двойной связи надуксусной кислотой до эпоксида **1**[227] (схема 1). Для получения предшественника карбоциклического аналога гуанозина эпоксициклопентен **1** конденсировали с 2-амино-6-хлорпурином в присутствии Pd(0)-катализатора, обеспечивающего регио- и стереоселективное протекание реакции (схема 2)[228].

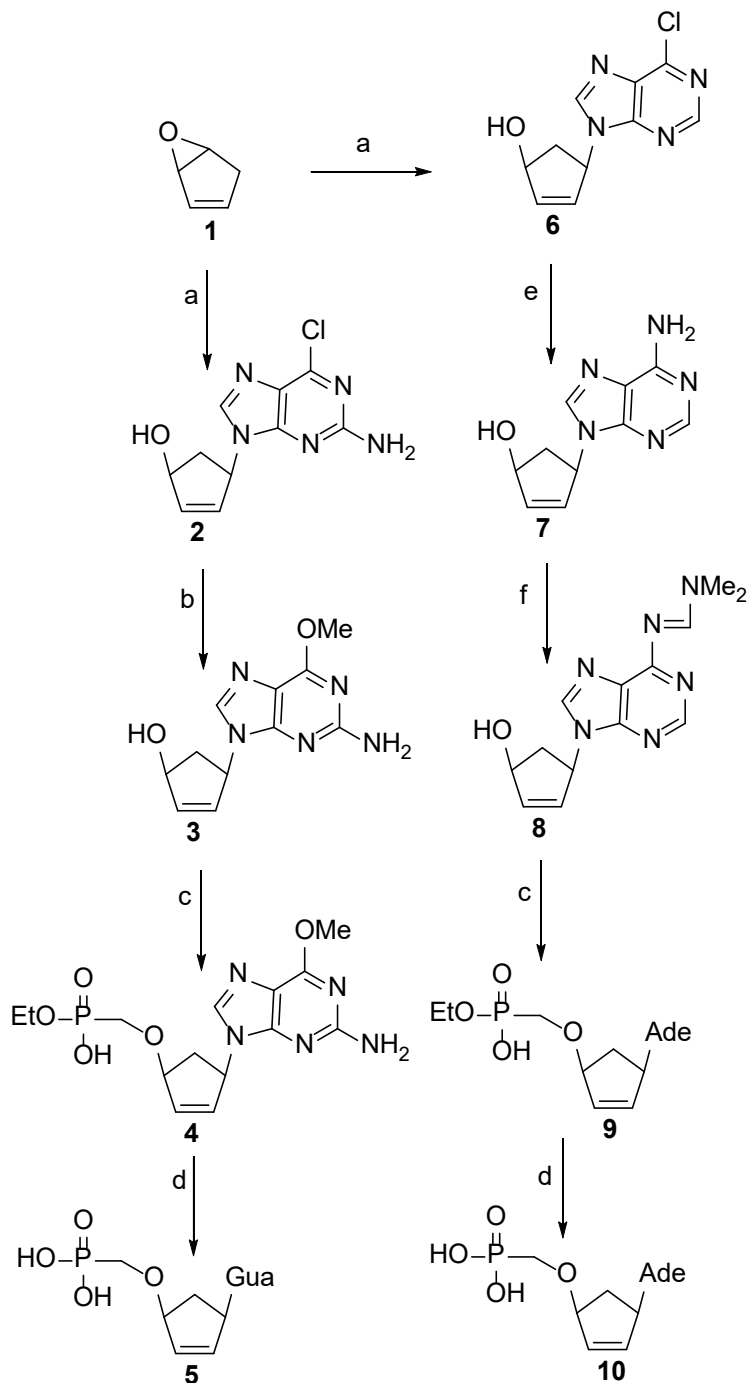


Схема 2. (a) Pd(PPh₃)₄, PPh₃, пурин (2-амино-6-хлорпурин для **2**, 6-хлорпурин для **6**); (b) K₂CO₃, MeOH; (c) NaH, Cs₂CO₃, TsOCH₂P(O)(OH)(OEt); (d) Me₃SiBr; (e) 7 M NH₃/MeOH, 120°C; (f) (MeO)₂CHNMe₂

Полученный 2-амино-6-хлор-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурин **2** представлял собой смесь энантиомеров. Соединение **2**, выделенное колоночной хроматографией на силикагеле, кипятили в метаноле в присутствии поташа, и полученное производное 2-амино-6-метоксипурина **3** вводили в реакцию фосфонометилирования. В качестве фосфоновой компоненты использовали этиловый эфир тозилоксиметилфосфоновой кислоты. Реакцию проводили в ДМФА в присутствии $\text{NaNH}:\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (1:2 моль/моль), что позволило повысить выход продукта **4** до 70% (против 50% в присутствии только NaNH). В результате обработки полученного соединения **4** триметилбромсиланом получили фосфонат карбоциклического аналога гуанозина **5** с общим выходом 39%, считая на **1**.

Сходная схема была использована для синтеза фосфоната карбоциклического аналога аденозина **10**. Эпоксид **1** конденсировали с 6-хлорпуринном в присутствии $\text{Pd}(0)$ катализатора, полученное производное **6** аминировали 7 М раствором аммиака в метаноле при 120°C в течение 4 часов. Использование аммиака более низкой концентрации (2 М) приводило к образованию побочного продукта, а именно 6-метокси-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурина. Полученное производное аденина **7** обрабатывали диметилацеталем диметилформамида и защищенный нуклеозид **8** конденсировали с этиловым эфиром тозилоксиметилфосфоновой кислоты. При отсутствии защиты на аминогруппе происходило образование побочного бис-фосфонометилированного продукта[229], выход которого составлял не менее 30% (по данным ТСХ). В результате обработки соединения **9** триметилбромсиланом получили фосфонат карбоциклического аналога аденозина **10** с общим выходом 23%. Структура фосфонатов **5** и **10** была подтверждена УФ, ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектрами. Данные спектров полностью совпали с литературными данными[228, 229].

В литературе описано несколько методов синтеза динуклеозидолигофосфатов и их фосфонатных аналогов. Так, Ar_3A и Ar_4A получали в результате взаимодействия избытка активированного АМФ с ортофосфатом (в случае Ar_3A),[230] пиррофосфатом[230] или АТФ (в случае Ar_4A)[231]. Активацию нуклеотидов проводили с помощью морфолина и дициклогексилкарбодиимида (ДЦК)[230], а также непосредственно ДЦК[232] или карбонильными производными азотсодержащих гетероциклов: карбонилдиимидазолом (КДИ), карбонилдитриазолом или карбонилдобензимидазолом[233]. В синтезе фосфонатных аналогов динуклеозидтетрафосфатов карбонильные производные азотсодержащих гетероциклов использовали для активации как нуклеотидной компоненты, так и метилendifосфоновой кислоты[234].

Для синтеза неизвестных ранее целевых динуклеозидтетрафосфонатов **12** и **16** (схемы 3 и 4, соответственно) в качестве активирующего агента мы использовали КДИ. Первоначально реакцию проводили в ДМФА в присутствии пятикратного избытка активирующего агента по отношению к исходному фосфонату **5**, и избыток КДИ гидролизovali метанолом. Добавление к полученному имидазолиду **11** (схема 3) двухкратного избытка бис(трибутиламмонийной) соли пирофосфата приводило к образованию сложной смеси карбоциклических продуктов. С помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии были выделены 11% целевого дифосфонатдифосфата **12**, 34% фосфонатдифосфата **13**, 25% дифосфоната **14**, 12% исходного фосфоната **5** и 9% метоксифосфоната **15**. Поскольку выход целевого продукта **12** оказался низким, мы оптимизировали условия реакции.

Замена ДМФА на смесь гексаметилфосфотриамида (ГМФТА) и ДМФА в соотношении 2:1 позволила увеличить растворимость исходного монофосфоната **5**; увеличение избытка КДИ до восьмикратного привело к уменьшению образования димера **14**; сокращение времени взаимодействия с метанолом с 1 ч до 20 мин исключило образование метилового эфира **15**. В результате реакции, проведенной в этих условиях, продукт **12** был выделен с выходом 24%. Кроме этого было получено 57% фосфонатдифосфата **13**. Продукты были охарактеризованы УФ, масс-, ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектрами. Характеристики фосфонатдифосфата **13** совпали с литературными⁴⁷, а данные для целевого соединения **12** приведены в таблице 1.

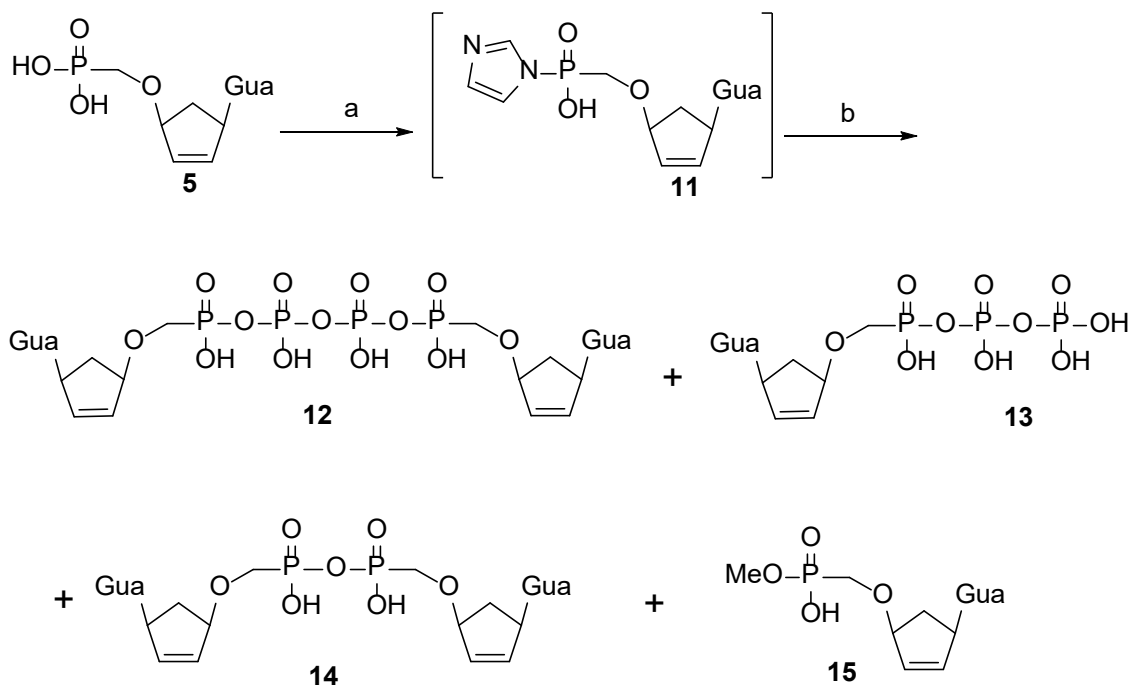


Схема 3. (a) 1) КДИ, 2) MeOH; (b) $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$

В аналогичной реакции имидазолида **11** и трибутиламмонийной соли ортофосфата был получен карбоциклический аналог дигуанозиндифосфонатфосфата **16** (схема 4). Продукт **16** был выделен с выходом 36% после последовательной очистки на DEAE-Toyopearl (градиент 0→0,4М NH_4HCO_3) и LiChroprep RP-18 (вода). Физико-химические характеристики соединения **16** приведены в таблице 2.

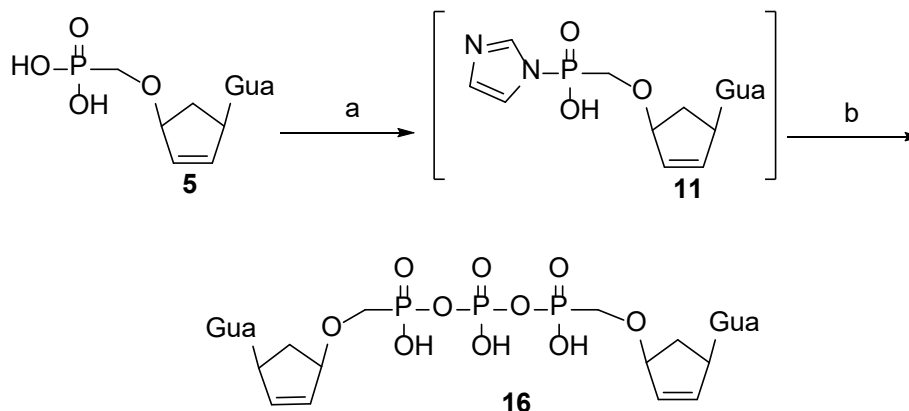


Схема 4. (a) 1) КДИ, 2) MeOH; (b) $(\text{Bu}_3\text{NH})\text{H}_2\text{PO}_4$

Для синтеза карбоциклического аналога дигуанозинтетрафосфоната, содержащего в положении β, β' остаток диформетилендифосфоновой кислоты, мы использовали три разных подхода, поскольку в условиях, отработанных нами для карбоциклического дигуанозиндифосфонатдифосфата **12** (схема 3), было получено только 12% целевого продукта **18**, 28% трифосфоната **17** и более 20% димера **14**.

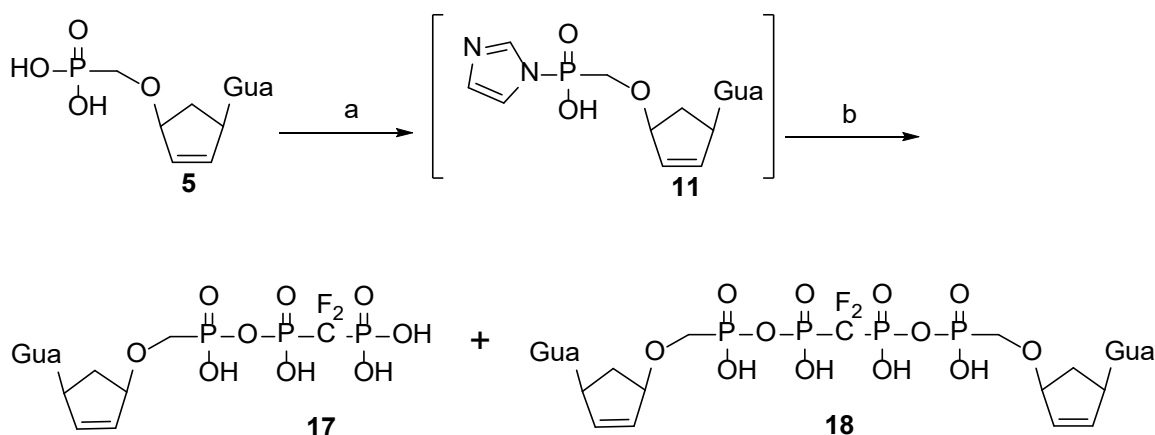
Первый подход предполагал подбор условий реакции для получения максимального выхода дигуанозинтетрафосфоната **18** в одну стадию (схема 5А). Уменьшение количества диформетилендифосфоновой кислоты с двух эквивалентов до полутора привело к понижению выхода трифосфоната **17** до 11% и повышению выхода целевого динуклеотида **18** до 31%. Однако выход побочного продукта **14** по-прежнему был около 20%.

Во втором варианте для предотвращения образования димера **14** мы активировали не монофосфонат **5**, а дифосфоновую компоненту. Диформетилендифосфоновую кислоту обработали восьмикратным избытком КДИ (схема 5В). К полученному бисимидазолиду **19** добавили пятикратный избыток фосфоната **5** и получили смесь целевого продукта **18** и трифосфоната **17** с выходами 35% и 31%, соответственно.

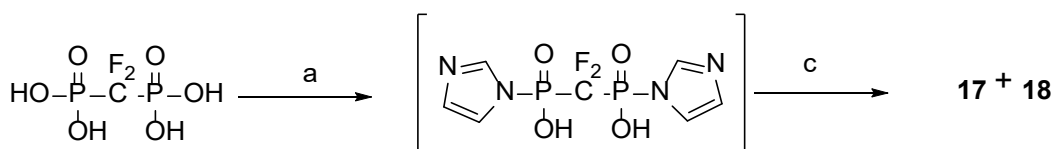
Третий подход предполагал синтез целевого продукта **18** в две стадии. На первой стадии мы оптимизировали условия конденсации активированного фосфоната **11** и

дифторметилендифосфоновой кислоты таким образом, чтобы максимально увеличить выход трифосфоната **17**, который в результате последующей реакции с имидазолидом **11** дает продукт **18** (схема 5С). Увеличение количества дифторметилендифосфоновой кислоты до трех эквивалентов повысило выход трифосфоната **17** до 70%, при этом выход соединения **18** составил менее 5%. Полученный трифосфонат **17** был выделен и очищен, а затем к нему добавили имидазолид **11**. Это позволило получить продукт **18** с выходом 55%. Таким образом, выход дигуанозинтетрафосфоната **18** за две стадии составил 38%.

A



B



C

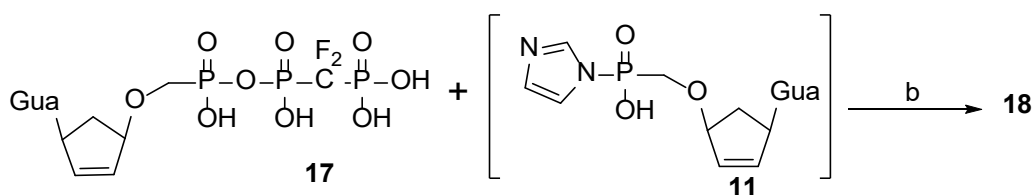
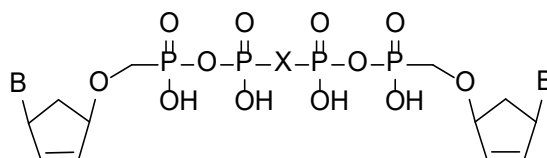


Схема 5. (a) 1) КДИ, 2) MeOH; (b) $(\text{HO})_2(\text{O})\text{PCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2 \cdot 2\text{Bu}_3\text{N}$; (c) фосфонат **5**

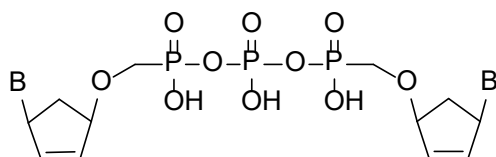
Карбоциклический аналог дигуанозинтетрафосфоната **20**, содержащий в положении β, β' остаток дибромметилендифосфоновой кислоты был получен из монофосфоната **5** и трибутиламмонийной соли дибромметилендифосфоновой кислоты в одну стадию (аналогично соединению **18**, схема 5А). Продукт **20** и соответствующий трифосфонат были выделены в условиях, описанных выше. Выход продукта **20** составил 35%, физико-химические данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. Выходы и физико-химические свойства синтезированных соединений.



| № | В | X | Выход, % | m/e [M ⁺] | УФ λ_{\max} , нм; (ϵ) | ³¹ P ЯМР (162 МГц, D ₂ O, δ , м.д.) | ¹⁹ F ЯМР (367 МГц, D ₂ O, δ , м.д.) |
|----|-----|------------------|-------------|--------------------------|---|--|--|
| 12 | Gua | O | 24 | 796.1 | 252 (18000) | 8.8 (д, J 22 Гц, P _{α}), -22.7 (д, P _{β}) | |
| 18 | Gua | CF ₂ | 38 | 830.3 | 252 (18000) | 10.4 (д, J 17 Гц, P _{α}), -5.7 (дт, $J_{P,F}$ 84 Hz, P _{β}) | -42.6 (т, $J_{F,P}$ 84 Гц) |
| 20 | Gua | CBr ₂ | 35 | 952.6 | 251 (18000) | 9.7 (д, J 26 Гц, P _{α}), -0.8 (д, P _{β}) | |
| 21 | Ade | O | 16 | 764.1 | 261 (27000) | 9.5 (д, J 22 Гц, P _{α}), -22.7 (д, P _{β}) | |
| 22 | Ade | CF ₂ | 27 | 798.1 | 261 (27000) | 9.7 (д, $J_{P\alpha,P\beta}$ 33 Гц, P _{α}), - 6.1 (дт, $J_{P,F}$ 81 Гц, P _{β}) | -43.4 (т, $J_{F,P}$ 81 Гц) |
| 23 | Ade | CBr ₂ | 21 | 920.2 | 261 (27000) | 9.7 (д, J 23 Гц, P _{α}), -0.8 (д, P _{β}) | |

Таблица 2. Выходы и физико-химические свойства синтезированных соединений.



| № соединения | В | Выход, % | m/e[M ⁺] | УФ λ_{\max} , нм; (ϵ) | ³¹ P ЯМР (162 МГц, D ₂ O, δ , м.д.) |
|-----------------|-----|-------------|----------------------|---|---|
| 16 | Gua | 36 | 716.1 | 250 (16000) | 9.1 (д, J 27 Гц, P _{α}), -22.3 (т, P _{β}) |
| 24 | Ade | 42 | 684.2 | 261 (25000) | 9.1 (д, J 24 Гц, P _{α}), -22.4 (т, P _{β}) |

Аденинсодержащие карбоциклические соединения **21**, **22** (см. таблицу 1) и **24** (см. таблицу 2) были синтезированы из монофосфоната **10** в одну стадию аналогично соответствующим производным гуанина, выделены методами ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии и охарактеризованы УФ, масс-, ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектрами. Следует отметить, что нам не удалось получить карбоциклический аналог диаденозинтетрафосфоната **23**, содержащий в положении β, β' остаток дибромметилendifосфоновой кислоты в условиях методов **A** и **B** (схема 5). Он был получен в две стадии по методу **C** (с выделением промежуточного трифосфоната) с выходом 21% в расчете на монофосфонат **10** (см. таблицу 1).

Таким образом, на основе 5'-норкарбоциклических аналогов аденозина и гуанозина осуществлен синтез неизвестных ранее динуклеозидолигофосфонатов, нового типа потенциальных ингибиторов биосинтеза провирусной ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ.

2.1.1.2 Стабильность карбоциклических аналогов динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозидтетрафосфонатов в сыворотке крови человека

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 **12** и **18**. Пуповинная сыворотка человека была использована в качестве модели биологически активной среды, богатой дефосфорилирующими и гидролизующими ферментами. Исследуемые соединения инкубировали со 100% пуповинной сывороткой крови человека при 37°C. Процесс гидролиза останавливали замораживанием; состав реакционной смеси анализировали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ, элюируя ТЕАВ в градиенте этанола. Для идентификации продуктов гидролиза использовали аутентичные образцы фосфоната **5** и трифосфонатов **13** и **17**.

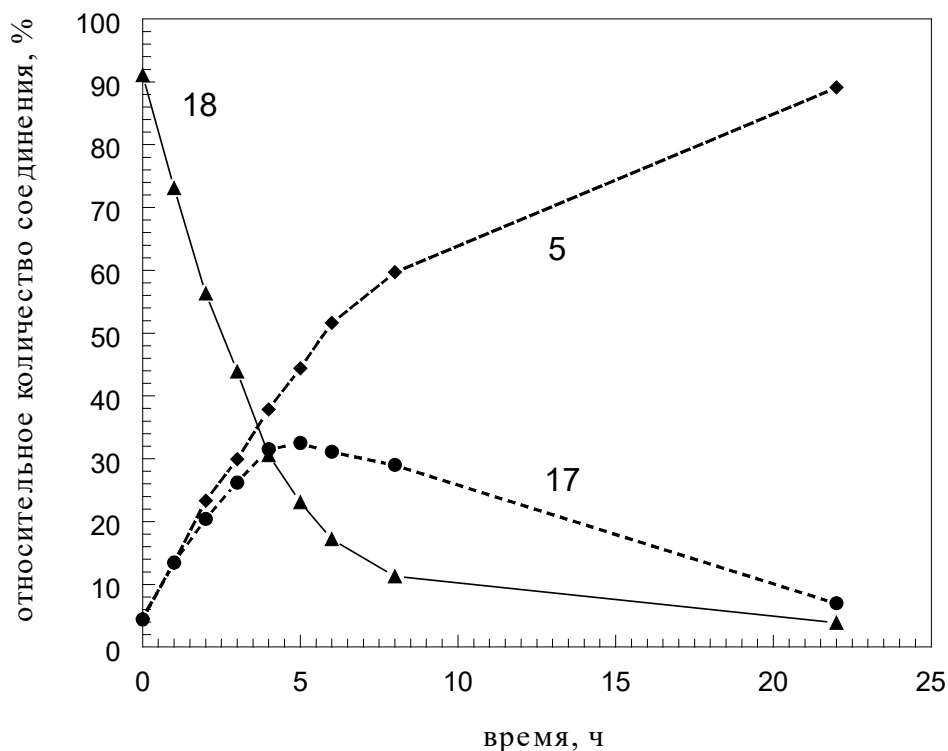


Рисунок 3. Гидролиз соединения **18** в пуповинной сыворотке крови человека.

Из рисунка 3 видно, что соединение **18** гидролизруется с образованием двух продуктов - монофосфоната **5** и трифосфоната **17**, при этом в течение первых трех часов накопление обоих продуктов происходит с одинаковой скоростью. Через 4 часа скорость гидролиза трифосфоната **17** становится сравнимой со скоростью его образования, количество трифосфоната в течение последующих 2-3 часов остается на одном уровне, а затем медленно уменьшается. Напротив, количество монофосфоната **5** в реакционной смеси постоянно возрастает и через 22 часа он является практически единственным продуктом. Гидролиз соединения **12** протекает аналогично. Интересно, что, несмотря на различную структуру β, β' -фрагментов, соединения **12** и **18** гидролизуются с одинаковой скоростью и дают одностипные продукты.

На основе ВЭЖХ анализа соотношения исходных соединений и образовавшихся продуктов были построены кривые скорости гидролиза и определено время гидролиза половинного количества соединений **12**, **17**, **18** и контрольного **dGTP** (таблица 3).

Таким образом, синтезированные нами динуклеозидолигофосфонаты при гидролизе в сыворотке крови образуют соответствующие трифосфонаты со скоростью,

позволяющей рассматривать эти динуклеозидолигофосфонаты в качестве потенциальных депо-форм.

Таблица 3. Сравнение скорости гидролиза соединений в сыворотке крови человека.

| Соединение | Время удерживания, мин | Время гидролиза половинного количества, ч |
|-------------|------------------------|---|
| 12 | 20.6±0.1 | 3±0.3 |
| 18 | 20.0±0.1 | 3±0.3 |
| 5 | 17.0±0.1 | - |
| 17 | 16.5±0.1 | 7±0.5 |
| dGTP | 12.3±0.1 | 0.3±0.03 |

2.1.1.3 Биологическая активность карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов

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)[235, 236]. 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 **12** и **21** 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 **16** и **24**) или β,β' -диформетилendifосфонового фрагмента (соединения **18** и **22**) понижало активность примерно на порядок, IC_{50} 8-20 мкМ. Дибромметилден-содержащие соединения **20** и **23** 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[235, 236].

В вирусологических испытаниях на клетках MT-4, инфицированных ВИЧ, проведенных в лаборатории проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск), синтезированные динуклеозид олигофосфаты 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[235].

Соединения **17** и **18** были дополнительно изучены в качестве ингибиторов теломеразы. Теломераза представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, который отвечает за сохранение длины теломер на концах хромосом большинства эукариот. Этот фермент удлиняет 3'-конец хромосомы путем достраивания теломерных повторов. Коровий фермент состоит из теломеразной обратной транскриптазы (ОТ) и теломеразной РНК, содержащей матричный участок для удлинения ДНК[237]. Теломераза активна в 85% раковых клеток, тогда как в обычных соматических тканях ее активность не обнаруживается. Укорочение длины теломер в опухолевых клетках приводит к их гибели значительно раньше, чем это происходит в нормальных клетках организма. Такая характеристика объясняет интерес к изучению этого фермента в качестве мишени для антираковой терапии. Показано, что в бесклеточном эксперименте на выделенном ферменте соединения **17** и **18** в концентрации 5 мкМ эффективно ингибировали синтез ДНК, катализируемый теломеразой[237].

Заключение по разделу 2.1.1.

Таким образом, синтезированные нами динуклеозидолигофосфонаты при гидролизе в сыворотке крови образуют соответствующие трифосфонаты, которые являются эффективными терминаторными субстратами обратной транскриптазы ВИЧ[235, 236]. Более того, динуклеозидолигофосфонаты способны сами ингибировать синтез ДНК, катализируемый ОТ ВИЧ или теломеразой[235-237]. 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.

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

Вторая часть данного раздела диссертационной работы посвящена синтезу 5'-норкарбоциклических производных урацила. Карбоциклическим фрагментом здесь, как и в предыдущей части, служит гидроксциклопентен.

Проанализировав биологические свойства различных нуклеозидных производных пиримидинового ряда, мы выбрали несколько типов модификаций молекулы 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила **25** (Рис. 4). Целевые соединения были синтезированы и изучены в качестве антивирусных и/или антибактериальных агентов.

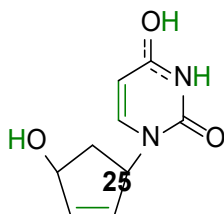


Рисунок 4. Возможные направления модификации (выделено зеленым цветом) 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила

Впервые 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацил **25** в виде индивидуальных изомеров был получен в группе проф. Шнеллера исходя из оптически чистых (+) и (-) изомеров 1-ацетил-4-гидрокси-2-циклопентена[238, 239]. В молекуле **25** имеется несколько положений по которым возможно проводить модификации. Урацил является удобной моделью для осуществления реакций электрофильного замещения. Реакция протекает по 5-му положению, в то же время 6-е положение является сложно достигаемым[121]. Также модификации возможны по 3-му положению основания и 4-гидроксильной группе (в случае таутомерии, лактамная форма), а в карбоциклическом фрагменте по 2',3'-двойной связи и 4'-гидроксильной группе. Следует еще раз подчеркнуть, что соединения этого типа не фосфорилируются клеточными ферментами и, следовательно, не могут действовать как НИОТ ВИЧ.

2.1.2.1. 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, способные эффективно связываться в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1, для создания препаратов с улучшенными фармакологическими и противовирусными свойствами. Поиск новых анти-ВИЧ агентов среди пиримидиновых производных выявил много активных молекул, обладающих различным строением. Эволюция структур и методы химического синтеза урацил-содержащих ННИОТ ВИЧ-1 подробно описаны в разделе 2 данной работы.

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 **25** или 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацил **26** в составе триароматической системы. Синтезированные соединения различались заместителями бензильного остатка в 3-ем положении гетероциклического основания и длиной линкера между 4'-положением карбоциклического фрагмента и ароматическим ядром, введенного по этому положению заместителя.

Производные **27-30** синтезировали путем бензоилирования 4'-гидроксильных групп соединений **25** и **26** действием бензоилхлорида в сухом пиридине в течение 8 часов при +36 °С (Схема 6). В слабоосновных условиях проведения реакции мы получили продукты бисацилирования **29** и **30**. Такие продукты характерны для N-1 замещенных производных урацила, которые являются очень слабыми основаниями (pK_a 3.38) и обладают значительной NH-кислотностью. Однако выход соединений **29** и **30** был низок (10-15 %). Использование 4-(диметиламино)пиридина в реакции соединений **27** и **28** с бензоилхлоридом в хлористом метиле в присутствии триэтиламина позволило повысить выход целевых продуктов **29** и **30** до 40%. Соединения **26-30** были проверены на способность ингибировать ОТ ВИЧ-1, но оказались неактивными.

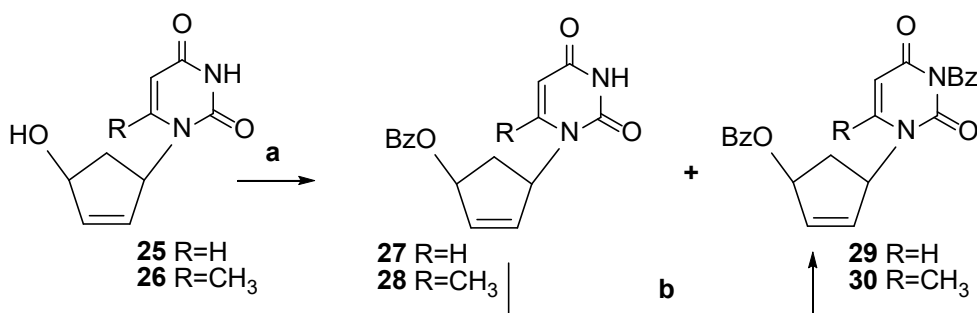


Схема 6. (a) BzCl, пиридин, +36 °C 8 ч.; (b) BzCl, NEt₃, DMAP, CH₂Cl₂

Следующим этапом стал синтез производных, несущих по 3-му положению основания бензильные остатки. Поскольку соединения **25** и **26** относительно легко подвергались бензоилированию, синтез мы начинали с введения бензильного остатка по 3-му положению 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацила. Обработкой исходных производных **25** и **26** бензилбромидом в растворе ДМФА в присутствии свежeproкаленного карбоната калия мы получали 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил **31** и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-6-метилурацил **32** с выходом 82 и 80 % соответственно (Схема 7).

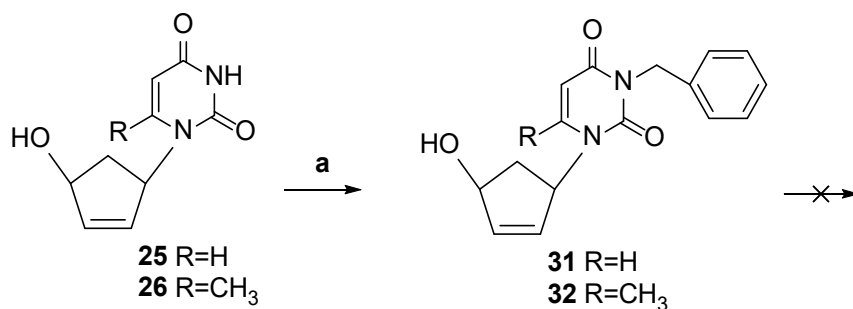


Схема 7. (a) BnBr, K₂CO₃, ДМФА, 18 ч.

На следующей стадии синтеза предполагалось присоединить бензоильную группу к 4'-гидроксигруппе. Но реакция по гидроксильной группе с использованием бензоилхлорида в стандартных условиях, и также в присутствии сильных оснований, не проходила. Замена последовательности стадий (обработка бензоилхлоридом, а далее бензилбромидом) позволила получить целевые продукты **33** и **34** с выходами 78 и 85% соответственно (Схема 8).

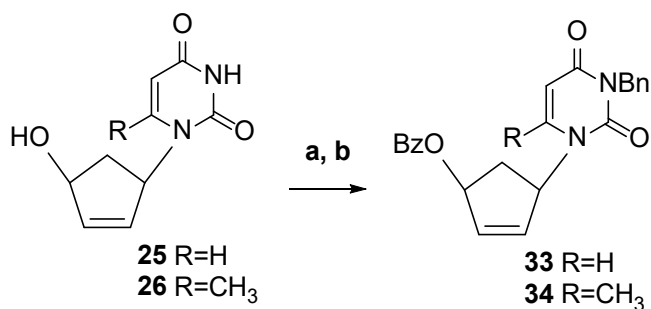
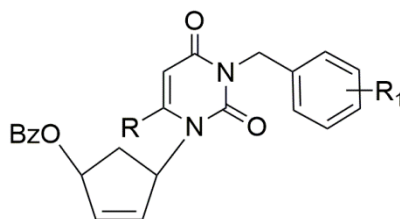


Схема 8. (a) BzCl, пиридин, 36°C 2 ч.; (b) BnBr, K₂CO₃, ДМФА, 18 ч.

3-Замещенные производные 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)урацила и 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацила **35-40** получали аналогичным способом, используя соответствующие бензилгалогениды (Рис. 5). Заместители в ароматическом ядре бензильного остатка в 3-ем положении урацила были выбраны на основании структур ННИОТ, несущих фрагменты, которые способствовали связыванию субстрата внутри гидрофобного «кармана» ОТ ВИЧ-1.



R=H: **35** R₁=4-CH₃, **36** R₁=2,4-(CH₃)₂, **37** R₁=3,5-(CH₃)₂, **38** R₁=3,5-F₂
 R=CH₃: **39** R₁=4-CH₃, **40** R₁=3,5-(CH₃)₂

Рисунок 5. 3-Замещенные производные 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)урацила

Структуры синтезированных соединений были подтверждены методами ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии, масс спектрометрии, чистота - методом ТСХ. В ¹H-ЯМР спектрах присутствовали все сигналы, характерные для карбоциклического фрагмента и пиримидинового основания, а в случае 3- или 4'-замещенных производных также сигналы протонов бензоильных и бензильных остатков. Фрагменты ¹H-ЯМР спектров подтверждающие структуру и положение введенных заместителей приведены в таблице 4.

Таблица 4. Физико-химические свойства и выход соединений **27-40**

| № | R | R ₁ | m/z [M+Na] | Фрагменты ¹ H-ЯМР спектров (400 МГц, δ м.д.) | Выход, % |
|-----------|-----------------|-------------------------------------|---------------|---|-------------|
| 27 | H | - | 321.5 | 8.75 (1H, c, NH), 8.05-8.03 (1H, м, H ₆), 7.92-7.91 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.52 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 7.40-7.38 (1H, м, H ₄ Bz) | 79 |
| 28 | CH ₃ | - | 335,2 | 9.21 (1H, c, NH), 8.05-8.03 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.42-7.40 (2H, м, H ₃ , H ₅), 6.03 (2H, м, H ₄ Bz), 2.03(3H, c, 6-CH ₃) | 88 |
| 29 | H | - | 425.4 | 7.94, 7.86 (4H, 2м, 2×H ₂ , 2×H ₆ Bz), 7.58-7.56, (2H, м, 2×H ₄ Bz), 7.42 -7.40 (4H, 2м, 2×H ₃ , 2×H ₅ Bz) | 40 |
| 30 | CH ₃ | - | 439.3 | 7.92, 7.89 (4H, 2м, 2×H ₂ , 2×H ₆ Bz), 7.65 (1H, м, H ₄ Bz), 7.53, 7.36 (5H, м, H ₄ , 2×H ₃ , 2×H ₅ Bz), 2.07(3H, c, 6-CH ₃) | 40 |
| 31 | H | - | - | 7.40-7.38 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 7.25-7.18 (3H, м, H ₃ , H ₄ , H ₅ Bn) | 82 |
| 32 | CH ₃ | - | - | 7.68-7.60 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 7.30-7.25 (3H, м, H ₃ , H ₄ , H ₅ Bn), 2.04 (3H, c, 6-CH ₃) | 80 |
| 33 | H | - | 411.1 | 7.91-7.90 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.40-7.35 (3H, м, H ₃ , H ₄ , H ₅ Bz), 7.23-7.17 (5H, м, Bn), 5.08-5.05 (2H, м, CH ₂) | 82 |
| 34 | CH ₃ | - | 425.3 | 7.99 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.44-7.42 (1H, м, H ₄ Bz), 7.34-7.22 (5H, м, Bn), 7.09 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 5.03 (2H, м, CH ₂) | 78 |
| 35 | H | 4-CH ₃ | 425.3 | 7.90 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.50-7.44 (1H, м, H ₄ Bz), 7.36-7.31(3H, м, H ₃ , H ₅ Bz, H ₆), 7.18-7.15 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 7.04-7.02 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 5.03-5.00 (2H, м, CH ₂), 2.23 (3H, c, 4-CH ₃) | 65 |
| 36 | H | 2,4-(CH ₃) ₂ | 439.3 | 7.92 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.51-7.49 (1H, м, H ₄ Bz), 7.40 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 6.93-6.91(2H, м, H ₃ , H ₅ Bn), 6.85 (1H, м, H ₆ Bn), 5.05-5.02 (2H, м, CH ₂), 2.35 (3H, c, 2-CH ₃), 2.19 (3H, c, 4-CH ₃) | 72 |
| 37 | H | 3,5-(CH ₃) ₂ | 439.3 | 7.97 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.57-7.55 (1H, м, H ₄ Bz), 7.46-7.44 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 7.25-7.24 (2H, м, H ₆ , H ₄ Bn), 7.08 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 5.07-5.03 (2H, м, CH ₂), 2.27 (6H, c, 2CH ₃) | 85 |
| 38 | H | 3,5-F ₂ | 447.2 | 7.93-7.91 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.51 (1H, м, H ₄ Bz), 7.37(2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 6.92-6.90 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 6.63-6.62 (1H, м, H ₄ Bn), 5.02-5.00 (2H, д, J= 4.46 Гц, CH ₂) | 94 |
| 39 | CH ₃ | 4-CH ₃ | 439.3 | 8.01-7.99 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.44 (1H, м, H ₄ Bz), 7.34-7.32(2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 7.05 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 6.99 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bn), 4.98 (2H, м, CH ₂) 2.24 (3H, c, 4-CH ₃), 2.08 (3H, c, 6-CH ₃) | 66 |
| 40 | CH ₃ | 3,5-(CH ₃) ₂ | 453.3 | 8.06-8.05 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bz), 7.50 (1H, м, H ₄ Bz), 7.40-7.36 (2H, м, H ₃ , H ₅ Bz), 6.88 (1H, м, H ₄ Bn), 6.72 (2H, м, H ₂ , H ₆ Bn), 2.25 (6H, c, 2CH ₃), 2.14 (3H, c, 6-CH ₃) | 78 |

Соединения **33-40** были оценены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1. Лучшую активность показали соединения **33** и **35** которые ингибировали ОТ ВИЧ-1 дикого типа в концентрации 13.4 и 18.7 мкМ соответственно. Было показано, что активность соединений **33, 35** 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.

Для оценки влияния расстояния между остатками циклопентена и бензоильной группы на анти-ВИЧ свойства были синтезированы соединения с линкерами разной длины. Замещенные производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила **41** и **42**, содержащие остатки фенилуксусной и гидрокоричной кислот по 4'-гидроксильной группе были синтезированы ацилированием 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила **25** хлорангидридами соответствующих кислот, которые получали кипячением с тионилхлоридом. Использование тионилхлорида для получения хлорангидридов кислот является очень распространенным методом. Реакция протекает с выделением SO_2 и HCl . Соответствующие кислоты мы кипятили в SOCl_2 с обратным холодильником в течение 4 часов. Далее реакционную массу концентрировали в вакууме водоструйного насоса. Остаток переупаривали 2 раза в свежеперегнанном CCl_4 , растворяли в расчетном объеме CCl_4 и использовали без очистки в последующих реакциях синтеза производных **41-45**. Необходимо отметить, что в реакциях с 3,5-диметилбензоилхлоридом и 3,5-дихлорбензоилхлоридом помимо целевых продуктов **44** и **45**, соответственно, получали также бисбензолированные соединения **53** и **54** (Рис.6), в то время как в остальных случаях образования продуктов бисбензоилирования не происходило. Замещение по 3-му положению основания проводили методом, описанным выше (Схема 9).

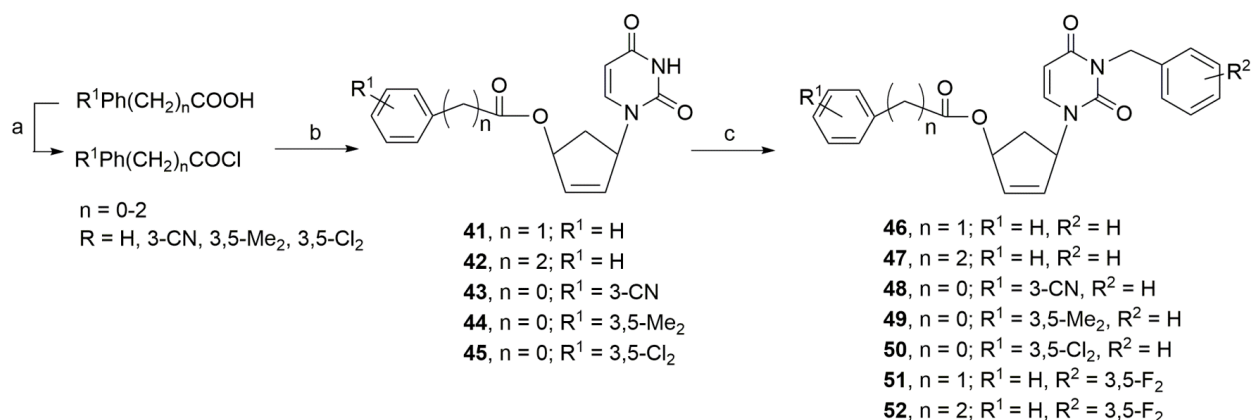


Схема 9. (а) $SOCl_2$, $80^\circ C$, 3 ч.; (б) **25**, пиридин, $36^\circ C$ 2 ч.; (с) BnBr, для **46-50**, 3,5-дифторбензилбромид для **51, 52**, K_2CO_3 , ДМФА, 18 ч.

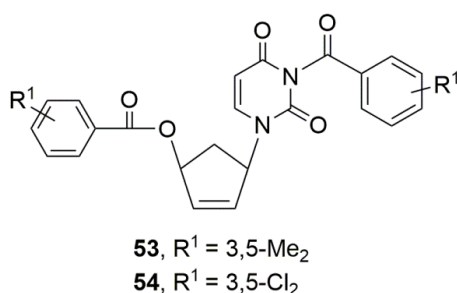


Рисунок 6. Структура бисбензолированных соединений **53** и **54**

Таблица 5. Физико-химические свойства и выход соединений **41-54**

| № | R^1 | R^2 | n | 1H -ЯМР спектры, $CDCl_3$ (400 МГц, δ м.д.) | Выход, % |
|-----------|---------------------|-------|-----|--|----------|
| 41 | H | - | 1 | 1.53-1.49 (1H, м, Hb-5'), 2.88-2.81 (1H, м, Ha-5'), 3.56 (2H, с, CH_2), 5.52-5.50 (1H, д, $J=8.05$ Гц, H-5), 5.60-5.58 (2H, м, H-1', H-4'), 5.87-5.85 (1H, м, H-3'), 6.19-6.17 (1H, м, H-2'), 6.89-6.87 (1H, д, $J=8.05$, H-6), 7.17 (2H, м, H-3'', H-5''), 7.24-7.20 (2H, м, H-2'', H-6''), 7.95 (1H, м, H-4''), 9.44 (1H, с, NH) | 52 |
| 42 | H | - | 2 | 1.53-1.48 (1H, м, Hb-5'), 2.65-2.63 (2H, м, CH_{2a}), 2.96-2.92 (3H, м, CH_{2b} , Ha-5'), 5.64-5.61 (2H, м, H-1', H-4'), 5.71-5.69 (1H, д, $J=8.04$ Гц, H-5), 5.91-5.89 (1H, м, H-3'), 6.21-6.19 (1H, м, H-2'), 7.08-7.06 (1H, д, $J=8.03$ Гц, H-6), 7.20-7.18 (3H, м, H-3'', H-4'', H-5''), 7.29-7.27 (2H, м, H-2'', H-6''), 9.37 (1H, с, NH) | 49 |
| 43 | 3-CN | - | 0 | 1.80-1.77 (1H, м, Hb-5'), 3.20-3.16 (1H, м, Ha-5'), 5.75-5.73 (1H, м, H-1'), 5.78-5.76 (1H, м, H-5), 5.91-5.88 (1H, м, H-4'), 6.07-6.04 (1H, м, H-3'), 6.40-6.39 (1H, м, H-2'), 7.24-7.23 (1H, д, $J=8.08$ Гц, H-6), 7.61-7.58 (1H, м, H-5''), 7.87-7.84 (1H, с, H-4''), 8.23-8.21 (1H, м, H-6''), 8.29-8.28 (1H, м, H-2''), 9.06 (1H, с, NH) | 71 |
| 44 | 3,5-Me ₂ | - | 0 | 1.85-1.80 (1H, м, Hb-5') 2.28 (6H, с, 2xCH ₃), 2.30 (6H, с, 2xCH ₃), 3.05-3.02 (1H, м, Ha-5'), 5.68-5.65 (1H, м, H-4'), 5.78-5.76 (1H, д, $J=8.14$ Гц, H-5), 5.82-5.80 (1H, м, H-1'), 6.01-5.99 (1H, м, H-3'), 6.39-6.38 (1H, м, H-2'), 7.15 (1H, с, H-4''), 7.20 (1H, с, H-4'''), 7.37-7.35 (1H, д, $J=8.14$ Гц, H-6), 7.47 (2H, с, H-2'', H-6''), 7.55 (2H, с, H-2''', H-6''') | 77 |
| 45 | 3,5-Cl ₂ | - | 0 | 1.83-1.80 (1H, м, Hb-5'), 3.15-3.07 (1H, м, Ha-5'), 5.66-5.63 (2H, м, H-4', H-5), 5.84-5.82 (1H, м, H-1'), 6.06-6.04 (1H, м, | 52 |

| | | | | | |
|----|---------------------|--------------------|---|--|----|
| | | | | H-3'), 6.39-6.37 (1H, м, H-2'), 7.20 (1H, с, H-4), 7.33-7.30 (1H, д, J=8.16 Гц, H-6), 7.52-7.51 (1H, м, H-4''), 7.57-7.56 (1H, м, H-4'''), 7.71 (2H, м, H-2'', H-6''), 7.81-7.80 (2H, м, H-2''', H-6''') | |
| 46 | H | H | 1 | 1.53-1.47 (1H, м, Hb-5'), 2.87-2.83 (1H, м, Ha-5'), 3.55 (2H, с, CH ₂), 5.05-5.03 (2H, д, J=8.22 Гц, CH ₂), 5.58-5.56 (3H, м, H-1', H-4', H-5), 5.85-5.83 (1H, м, H-3'), 6.17-6.15 (1H, м, H-2'), 6.84-6.82 (1H, м, H-6), 7.26-7.15 (8H, м, H-3'', H-4'', H-5'', 5Bn), 7.41-7.39 (2H, м, H-2'', H-6'') | 35 |
| 47 | H | H | 2 | 1.50-1.46 (1H, м, Hb-5'), 2.64-2.60 (2H, м, CH _{2a}), 2.96-2.91 (3H, м, CH _{2b} , Ha-5'), 5.08-5.05 (2H, м, CH ₂ Bn), 5.66-5.60 (2H, м, H-1', H-4'), 5.75-5.73 (1H, д, J=8.02 Гц, H-5), 5.90-5.88 (1H, м, H-3'), 6.19-6.18 (1H, м, H-2'), 7.02-7.00 (1H, м, H-6), 7.17-7.15 (3H, м, H-3'', H-4'', H-5''), 7.30-7.23 (5H, м, Bn), 7.49-7.47 (2H, м, H-2'', H-6'') | 60 |
| 48 | 3-CN | H | 0 | 1.78-1.74 (1H, м, Hb-5'), 3.17-3.14 (1H, м, Ha-5'), 5.17-5.11 (2H, м, CH ₂), 5.75-5.72 (1H, м, H-1'), 5.82-5.80 (1H, м, H-5), 5.90-5.87 (1H, м, H-4'), 6.05-6.03 (1H, м, H-3'), 6.38-6.36 (1H, м, H-2'), 7.19-7.17 (1H, д, J=8.03 Гц, H-6), 7.30-7.28 (3H, м, Bn), 7.48-7.47 (2H, м, Bn), 7.58-7.49 (1H, м, H-5''), 7.60-7.57 (1H, с, H-4''), 7.86-7.83 (1H, м, H-6''), 8.22-8.21 (1H, м, H-2'') | 79 |
| 49 | 3,5-Me ₂ | H | 0 | 1.83-1.79 (1H, м, Hb-5'), 2.35 (6H, с, 2×CH ₃), 3.10-3.06 (1H, м, Ha-5'), 5.75-5.73 (2H, м, H-4', H-5), 5.88-5.85 (1H, м, H-1'), 6.02-6.00 (1H, м, H-3'), 6.42-6.40 (1H, м, H-2'), 7.20 (1H, с, H-4''), 7.34-7.32 (1H, д, J=8.05 Гц, H-6), 7.59-7.42 (2H, с, H-2'', H-6''), 9.31 (1H, с, NH) | 63 |
| 50 | 3,5-Cl ₂ | H | 0 | 1.81-1.77 (1H, м, Hb-5'), 3.17-3.10 (1H, м, Ha-5'), 5.79-5.77 (2H, м, H-4', H-5), 5.89-5.86 (1H, м, H-1'), 6.06-6.04 (1H, м, H-3'), 6.40-6.37 (1H, м, H-2'), 7.27-7.25 (1H, д, J=8.16 Гц, H-6), 7.56 (1H, м, H-4''), 7.85-7.84 (2H, м, H-2'', H-6''), 9.08 (1H, с, NH) | 60 |
| 51 | H | 3,5-F ₂ | 1 | 1.45-1.41 (1H, м, Hb-5'), 2.56-2.54 (2H, м, CH _{2a}), 2.89-2.85 (3H, м, CH _{2b} , Ha-5'), 5.04-4.96 (2H, м, CH ₂ Bn), 5.57-5.55 (2H, м, H-1', H-4'), 5.70-5.68 (1H, д, J=8.04 Гц, H-5), 5.85-5.83 (1H, м, H-3'), 6.15-6.13 (1H, м, H-2'), 6.66-6.60 (1H, м, H-4'''), 6.92-6.89 (2H, м, H-2''', H-6'''), 7.00-6.98 (1H, д, J=8.06 Гц, H-6), 7.11-7.09 (3H, м, H-3'', H-4'', H-5''), 7.19-7.17 (2H, м, H-2'', H-6'') | 51 |
| 52 | H | 3,5-F ₂ | 2 | 4.93 (2H, с, CH ₂), 5.63-5.62 (1H, дд, J=7.80 и 2.20 Гц, H-5), 7.26-7.23 (3H, м, H-3', H-5', H-6'), 7.48-7.45 (1H, м, H-4'), 7.61-7.58 (2H, т, J=7.60, H-3'', H-5''), 7.75-7.72 (1H, тд, J=7.60 и 0.80 Гц, H-4''), 7.79-7.78 (1H, д, J=7.80 Гц, H-6), 8.13-8.12 (2H, дд, J=7.60 и 0.90 Гц, H-2'', H-6''), 11.38 (1H, с, NH) | 98 |
| 53 | 3,5-Me ₂ | - | 0 | 1.81-1.77 (1H, м, Hb-5'), 2.35 (6H, с, 2×CH ₃) 3.08-3.05 (1H, м, Ha-5'), 5.15-5.12 (2H, м, CH ₂), 5.75-5.73 (1H, м, H-1'), 5.80-5.78 (1H, м, H-5), 5.87-5.84 (1H, м, H-4'), 6.00-5.98 (1H, м, H-3'), 6.40-6.39 (1H, м, H-2'), 7.20 (1H, с, H-4''), 7.30-7.25 (4H, м, H-6, Bn), 7.49-7.47 (2H, м, Bn), 7.59 (2H, с, H-2'', H-6'') | 18 |
| 54 | 3,5-Cl ₂ | - | 0 | 1.72-1.68 (1H, м, Hb-5'), 3.09-3.01 (1H, м, Ha-5'), 5.08-5.05 (2H, м, CH ₂), 5.66-5.65 (1H, м, H-1'), 5.68-5.67 (1H, м, H-5), 5.80-5.75 (1H, м, H-4'), 5.98-5.96 (1H, м, H-3'), 6.31-6.28 (1H, м, H-2'), 7.14-7.12 (1H, д, J=8.06 Гц, H-6), 7.23-7.19 (3H, м, Bn), 7.42-7.41 (2H, м, Bn), 7.49 (1H, с, H-4''), 7.78-7.77 (2H, м, H-2'', H-6'') | 20 |

¹H-ЯМР спектрах соединений **41-54** присутствовали сигналы, характерные для урацила и бензильной группы, а также сигналы протонов карбоциклического фрагмента, линкера и фенильного остатка. Данные ¹³C-ЯМР масс-спектров также подтвердили структуры синтезированных соединений.

Полученные соединения были оценены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1. В зависимости от типа заместителя, константа ингибирования (K_i) фермента, соответствующего дикому штамму вируса составляла от 5 до 60 мкМ. Наиболее перспективные соединения **33**, **35**, **49** и **50** были дополнительно изучены на мутантных формах ОТ ВИЧ, соответствующих наиболее широко распространенным резистентным штаммам вируса (таблица 6). 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.

Таблица 6. Активность соединений в отношении выделенных мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса

| Форма ОТ | 49 | 50 | 33 | 35 |
|---------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | K_i , мкМ | | | |
| WT | 8.2 | 5.1 | 13.4 | 18.7 |
| L100I | 2.1 | 1.3 | 1.2 | 2.4 |
| K103N | 17.3 | 8.8 | 33.6 | 55.4 |
| V106A | >20 | >10 | >50 | >50 |
| Y181C | >20 | >10 | >50 | >50 |
| G190A | >>100 | >>100 | >50 | >50 |
| K103N / Y181C | >20 | >10 | >50 | >50 |

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. **33**, **49**, **50**) или наличии одной в *пара* положении (соед. **35**). Наличие заместителей в 2,4- или 3,5- положениях N-3 бензильного остатка (соед. **36-38**) снижает величину K_i примерно

в 1фаз. Присутствие метильной группы в 6-ом положении основания (соед. **34**, **39**, **40**) приводит к потере ингибиторной активности.

Для оценки эффективности связывания соединений в гидрофобном «кармане» ОТ-ВИЧ было проведено компьютерное моделирование взаимодействия соединений **25-54** с обратной транскриптазой ВИЧ-1 (работа проведена Д.А. Бабковым, ВолгМУ). В основе исследования лежал анализ конформаций соединений-ингибиторов и стерических контактов при их связывании в гидрофобном «кармане» обратной транскриптазы. Во многих случаях анализ стерических ограничений, наличия водородных связей и полярных групп при докинге лиганд-белок позволяет сделать качественные выводы о возможности связывания и понять его механизм. Основным допущением в анализе являлась структурная близость бензилпиримидинового фрагмента соединений с бензофеноновым фрагментом описанных ранее ННИОТ фирмы GlaxoSmithKline (GF128590 и др.), для которых существуют данные РСА комплексов с обратной транскриптазой[240].

После компьютерной оптимизации геометрии связей, активные соединения размещали в «кармане» обратной транскриптазы посредством программ компьютерного моделирования Coot и ccr4mg. Анализ включал исследования возможных стерических контактов (пересечения ван-дер-Ваальсовских сфер атомов) и взаимодействий между атомами синтезированных молекул и ОТ ВИЧ-1, также возможное вращение одинарных связей аминокислотных остатков ОТ ВИЧ-1, вращение одинарных связей соединений и возможные нековалентные взаимодействия между атомами. Координаты пиримидинового и бензольного колец соединения **33** максимально точно соответствовали координатам двух бензольных колец лиганда GF128590 (Рис. 7).

При связывании производного **33**, бензольное и пиримидиновое кольцо плотно размещались в «кармане» активного центра. При этом связывание бензольных колец происходит в основном за счет гидрофобного взаимодействия и полного исключения воды при контакте белок-лиганд. Размещение атомов «хвоста» соединения **33**, включающего циклопентен и бензольную группу, было выполнено посредством вращения одинарных связей (Рис. 7). Как следует из стерических контактов, «хвостовая» часть соединения размещается очень плотно.

В отличие от бензофенонов, «хвост» молекулы может располагаться только в другой области «кармана» фермента, как показано на рисунке 7 для соединения **33**. «Хвостовая» часть тесно контактирует с Val 179, Ile 180 (домен А) и Glu 138 домена В ОТ ВИЧ-1. Также возможно взаимодействие с Lys 101, особенно для атомов циклопентена. Доступной поверхности воды экспонированы только атомы бензольного кольца.

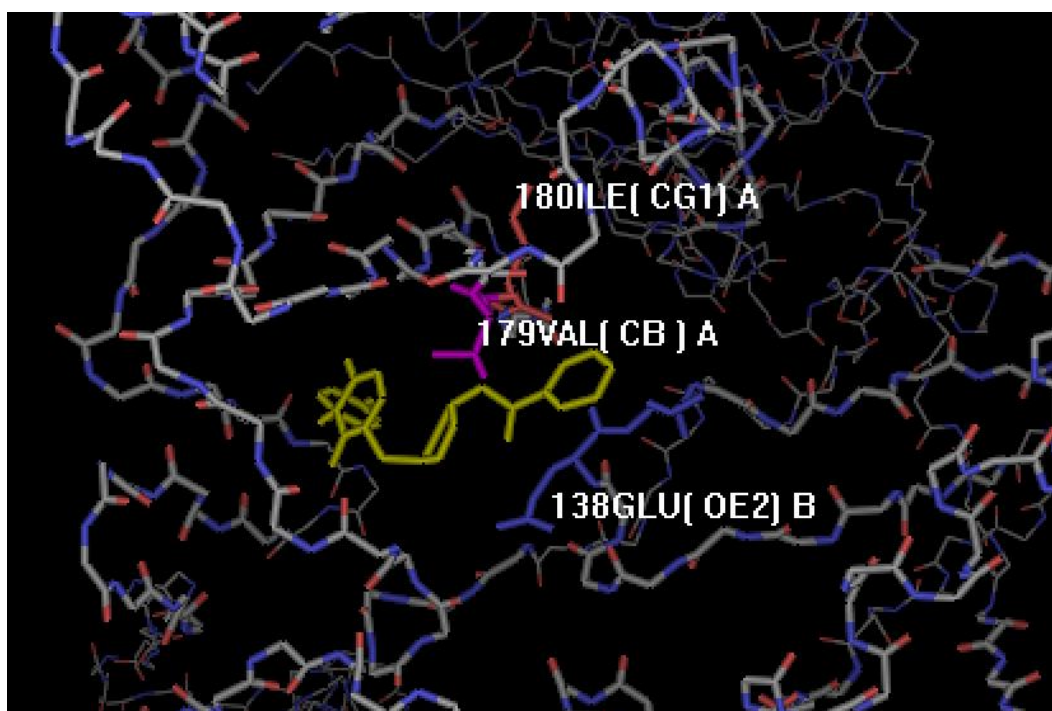


Рисунок 7. Размещение 5'-норкарбоциклического аналога **33** в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1

Более тесное связывание данных соединений в «кармане» белка (включая «хвостовую» цепь) предположительно объясняет более сильную чувствительность связывания к введению дополнительных метильных групп в бензольное кольцо. При их отсутствии соединение **33** может связываться с ферментом. Связывание также происходит при наличии одной метильной группы в 4-ом положении бензольного кольца (**35**), которая имеет один слабый стерический контакт с Trp 229 (~ 2.8 Å). Наличие заместителей в 2,4- и 3,5-положениях резко ухудшают связывание и, тем самым, ингибирование ОТ ВИЧ-1. Размещение «хвостовой» части молекулы, показанное на рисунке 7, позволяет объяснить плохое связывание соединений **34**, **39** и **40** при появлении метильной группы в 6-ом положении пиримидинового кольца. Эта группа сильно удалена от всех атомов белка, но расстояние между углеродом пиримидинового кольца и ближайшим углеродом цикlopентена составляет около 2.7 Å, что и ведет к невозможности размещения «хвоста» соединения при подобных заменах. Проведенное компьютерное моделирование позволило объяснить, почему некоторые карбоциклические производные (**33**, **35**, **49**, **50**) способны ингибировать ОТ ВИЧ-1 в концентрации 13-17 мкМ, тогда как для других (**34**, **36-48**, **51-54**) активность была заметно ниже.

Таким образом, впервые было показано, что новые аналоги карбоциклического 5'-норуридина способны ингибировать ОТ ВИЧ-1 посредством связывания в гидрофобном

«кармане» фермента[143, 144, 235, 236, 241]. Данные компьютерного анализа позволяют сделать вывод о предпочтительных местах модификации молекулы 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентенил)урацила, что существенно для дальнейших разработок нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ.

Биологическая активность соединений, описанных в данном разделе, была дополнительно исследована в отношении широкого круга патогенов. Соединения **37**, **40** и **49** проявили выраженные ингибирующие свойства против *Trypanosoma brucei*[242], простейших паразитов, которые вызывают спектр тропических болезней у людей и животных.

2.1.2.2. 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. С другой стороны, заместители, введенные в 5-е положение пиримидинового цикла, например, галогены, активированы электроотрицательными атомами азота (N) и кислорода (O), и могут относительно легко вступать в реакции уже нуклеофильного замещения, что в конечном итоге значительно расширяет возможности получения и спектр фармакологического действия различных 5-замещенных пиримидинов.

5-Фтор-2'-дезоксидеоксиуридин, один из первых и наиболее изученных противораковых препаратов, 5-этил-2'-дезоксидеоксиуридин, 5-йод-2'-дезоксидеоксиуридин (IDU) и 5-(E)-(-2-бромвинил)-2'-дезоксидеоксиуридин (BVDU), полученные в 60-х годах прошлого века и примененные позже как антивирусные агенты против HSV-1 и VZV, положили начало синтезу и изучению биологических свойств 5-замещенных аналогов пиримидиновых нуклеозидов[243]. Биологическая активность этих соединений зависит от их способности превращаться в соответствующие 5'-O-фосфорилированные метаболиты[244]. Наиболее активным антивирусным агентом среди 5-замещенных 2'-дезоксидеоксиуридинов оказался BVDU, который в зависимости от клеточной линии ингибировал репликацию HSV-1 и VZV с EC₅₀ 0,001-0,1 мкг/мл и 0,001-0,01 мкг/мл соответственно[244]. Карбоциклические аналоги 5-йод-2'-дезоксидеоксиуридина (C-IDU) и 5-(2-бромвинил)-2'-дезоксидеоксиуридина (C-BVDU) также проявили себя как селективные ингибиторы HSV-1 (EC₅₀ 0,1 мкг/мл и 0,02

мкг/мл соответственно), а дополнительным преимуществом карбонуклеозидов была их устойчивость к действию дезокситимидин- и уридин-фосфорилаз[245].

Ранее нами было показано наличие активности против ВИЧ-1 и EBV у 1-бензил производных 5-ариламиноурацила[246]. 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.

Конденсация 5-ариламинопроизводных урацила, которые были нам любезно предоставлены коллегами из Волгоградского государственного медицинского университета, с эпокси-циклопентеном позволила получить соединения **55-59** (Схема 10)

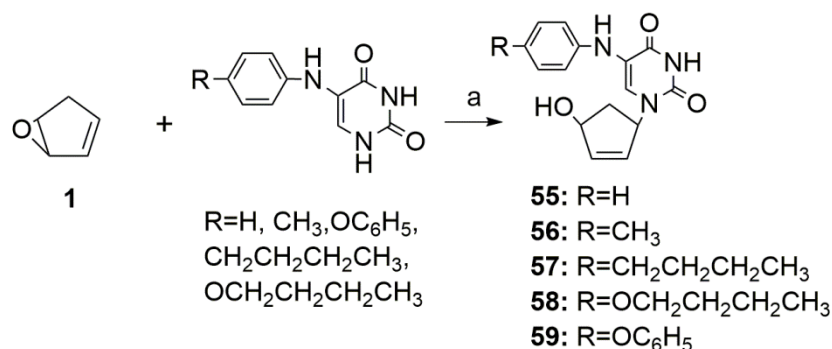


Схема 10. (а) Pd(PPh₃)₄, 5-фениламиноурацил для **55**, 5-(*n*-метилфениламино)урацил для **56**, 5-(*n*-бутилфениламино)урацил для **57**, 5-(*n*-бутилоксифениламино)урацил для **58**, 5-(*n*-фенокси фениламино)урацил для **59**, ДМФА/ТГФ

5-Ариламинозамещенные урацилы обладают слабой растворимостью в ДМФА, поэтому перед реакцией гетерогенную смесь интенсивно перемешивали на магнитной мешалке при нагревании до 50 °С. После стандартных процедур выделения и отчистки, выход целевых соединений **55-59** составил 18-25 %. Выход реакции конденсации невысок, в среднем он составляет 30-45 %. В случае применения избытка эпокси-циклопентена выход целевых соединений **55-59** возрастал до 35-49%, также получали продукты бисприсоединения эпокси-циклопентена **60-64** с выходом 35-39% (Рис.8).

Структуры синтезированных соединений были подтверждены методами ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии, чистота – методом ТСХ. В ¹H-ЯМР спектрах присутствовали все сигналы, характерные для карбоциклического фрагмента, пиримидинового основания и ариламиновых остатков. В случае продуктов бисприсоединения эпокси-циклопентена **60-64** наблюдалось удвоение интегралов сигналов, соответствующих протонам карбоциклического фрагмента и отсутствие сигнала

протона Н-3. В таблице 7 приведены сигналы ^1H ЯМР спектров, подтверждающие структуру и положение введенных заместителей.

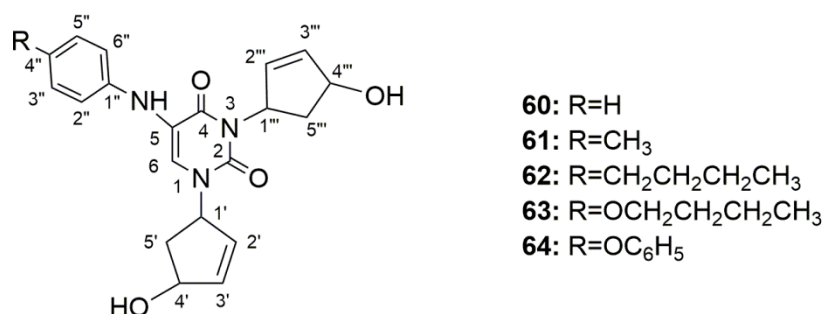


Рисунок 8. 5-Ариламинопроизводные N^1, N^3 -ди-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила.

Полученные соединения были изучены в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1, но не показали активности ($K_i \gg 200$ мкМ) и только производное **59** ингибировало фермент в концентрации 119 мкМ[241, 247].

В ходе систематических исследований ряда производных пиримидинов у многих из них были обнаружены выраженные антибактериальные свойства[248]. Основываясь на недавних сообщениях о серии N^1 -бензилпиримидинов[249], обладающих ингибирующей активностью по отношению к тимидинмонофосфаткиназе *Mycobacterium tuberculosis* (TMP-киназа *M. tuberculosis*), полученные производные **55-64** были переданы в Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза РАМН для изучения противотуберкулезной активности. Оказалось, что соединения **59**, **61** и **63** способны влиять на активное деление микобактериальных клеток. Полное ингибирование роста лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv веществами **59**, **61** и **63** 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 пипразинамид), составили 5 мкг/мл для соединения **63** и 20 мкг/мл для соединения **61**[247, 250].

Цитотоксичность синтезированных соединений изучали методом МТТ на культуре клеток *Vero*. Соединения **55-64** не проявляли токсичности вплоть до концентрации 250 мкМ.

Таблица 7. Физико-химические свойства и выход соединений 55-64

| № | R | HRMS, m/z | УФ λ max, (ε) | ¹ H ЯМР спектр (400 МГц, δ м.д.) | Выход, % |
|----|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|-------------|
| 55 | H | 308.1001 [M+Na] ⁺ | 263.4 (21500), 331.8 (9700) | 11.46 (1H, c, NH), 7.41 (1H, c, H-6), 7.12-7.08 (2H, м, H-2'', H-6''), 7.01 (1H, c, 5-NH), 6.80-6.78 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.69-6.67 (1H, м, H-4''), 6.14-6.12 (1H, д, J=5.52 Гц, H-2'), 5.85-5.83 (1H, д, J=5.51 Гц, H-3'), 5.47-5.45 (1H, м, H-1'), 5.25 (1H, c, OH), 4.64- 4.62 (1H, м, H-4'), 2.76-2.72 (1H, м, H _a -5'), 1.46-1.43 (1H, м, H _b -5'). | 20 |
| 56 | CH ₃ | 300.1342 [M+H] ⁺ | 264.2 (20300), 334.8 (8400) | 11.44 (1H, c, NH), 7.35 (1H, c, H-6), 6.94-6.92 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.85 (1H, c, 5-NH), 6.75-6.73 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.13-6.11 (1H, д, J=5.52 Гц, H-2'), 5.83-5.81 (1H, д, J=5.52 Гц, H-3'), 5.47-5.44 (1H, м, H-1'), 5.26 (1H, c OH), 4.63- 4.61 (1H, м, H-4'), 2.75-2.67 (1H, м, H _a -5'), 2.17 (3H, c, CH ₃), 1.45-1.39 (1H, м, H _b -5'). | 21 |
| 57 | nBu | 342.1805 [M+H] ⁺ | 261.4 (22400), | 11.45 (1H, c, NH), 7.37 (1H, c, H-6), 6.95-6.93 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.87 (1H, c, 5-NH), 6.76-6.74 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.14-6.12 (1H, м, H-2'), 5.84-5.83 (1H, м, H-3'), 5.48-5.45 (1H, м, H-1'), 5.27 (1H, c, OH), 4.63- 4.62 (1H, м, H-4'), 2.74-2.70 (1H, м, H _a -5'), 2.46-2.42 (2H, м, CH ₂), 1.49-1.47 (3H, м, H _b -5', CH ₂), 1.31-1.29 (2H, м, CH ₂), 0.90-0.88 (3H, мм, CH ₃) | 17 |
| 58 | nBuO | 380.1570 [M+Na] ⁺ | 262.2 (21100) | 11.44 (1H, c, NH), 7.28 (1H, c, H-6), 6.84-6.82 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.75-6.72 (3H, м, 5-NH, H-3'', H-5''), 6.13-6.11 (1H, д, J=5.52 Гц, H-2'), 5.83-5.80 (1H, д, J=5.51 Гц, H-3'), 5.48-5.44 (1H, м, H-1'), 5.26 (1H, c, OH), 4.63- 4.61 (1H, м, H-4'), 3.88-3.85 (2H, м, CH ₂), 2.74-2.66 (1H, м, H _a -5'), 1.65-1.63 (2H, м, CH ₂), 1.44-1.41 (3H, м, CH ₂ , H _b -5'), 0.94-0.90 (3H, м, CH ₃) | 22 |
| 59 | C ₆ H ₅ O | 400.1258 [M+Na] ⁺ | 265.3 (26750), 328.8 (9320) | 11.45 (1H, c, NH), 7.40 (1H, c, H-6), 7.32-7.30 (2H, м, H-3Ph, H-5Ph), 7.04 (2H, м, H-2' и H-6'), 6.89-6.88 (2H, м, H-3', H-5'), 6.84 (3H, c, H-2Ph, H-4Ph, H-6Ph), 6.14-6.13 (1H, д, J=5.50 Гц, H-2'), 5.84-5.83 (1H, д, J=5.51 Гц, H-3'), 5.48-5.46 (1H, м, H-1'), 5.28-5.27 (1H, м, H-4') 4.63- 4.62 (1H, c OH), 2.71-2.67 (1H, м, H _a -5'), 1.44-1.41 (1H, м, H _b -5') | 18 |
| 60 | H | 390.1417 [M+Na] ⁺ | 264.7 (15360), 336.7 (6000) | 7.37 (1H, c, H-6), 7.24-7.21 (3H, м, H-3'', H-5''), 6.95-6.94 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.90-6.86 (1H, м, H-4''), 6.20-6.19 (1H, д, J=5.51 Гц, H-2'), 6.14-6.13 (1H, д, J=5.50 Гц, H-2'''), 5.99-5.97 (2H, м, H-1', H-1'''), 5.82-5.81 (1H, д, J=5.52 Гц, H-3'), 5.77-5.75 (1H, д, J=5.49 Гц, H-3'''), 5.65-5.62 (1H, м, H-4'), 4.85- 4.83 (1H, м, H-4'''), 4.71 (1H, c, OH'), 4.24 (1H, c, OH'''), 2.92-2.82 (2H, м, H _a -5', H _a -5'''), 2.0 (1H, м, H _b -5'), 1.96 (1H, м, H _b -5''') | 39 |

| | | | | | |
|----|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|----|
| 61 | CH ₃ | 404.1570 [M+Na] ⁺ | 265.4 (1900) | 7.27 (1H, с, H-6), 7.05-7.03 (2H, м, H-3''', H-5'''), 6.87-6.85 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.19-6.17 (1H, д, J=5.52 Гц, H-2'), 6.14-6.13 (1H, д, J=5.51 Гц, H-2'''), 6.00-6.99 (1H, м, H-1'), 5.97 (1H, м, H-1'''), 5.82-5.81 (1H, д, J=5.50 Гц, H-3'), 5.77-5.75 (1H, д, J=5.51 Гц, H-3'''), 5.75-5.63 (1H, м, H-4'), 4.85-4.84 (1H, м, H-4'''), 4.71 (1H, с, OH'), 4.27 (1H, с, OH'''), 2.82-2.76 (2H, м, H _a -5', H _a -5'''), 2.25 (3H, с, CH ₃), 2.0 (1H, м, H _b -5'), 1.65 (1H, м, H _b -5') | 35 |
| 62 | <i>n</i> Bu | 423.2141 [M] ⁺ | 336.2 (8300) | 7.98 (1H, с, 5-NH), 7.29 (1H, м, H-6), 7.06-7.04 (3H, м, H-3'', H-5''), 6.89-6.87 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.20-6.18 (1H, м, H-2'), 6.15-6.14 (1H, м, H-2'''), 6.00-5.97 (1H, м, H-3'), 5.94 (1H, м, H-1'), 5.82-5.81 (1H, м, H-3'''), 5.77-5.76 (1H, м, H-1'''), 5.64-5.62 (1H, м, H-4'), 4.85-4.84 (1H, м, H-4'''), 4.72 (1H, с, OH'), 4.25 (1H, с, OH'''), 2.85-2.80 (2H, м, H _a -5', H _a -5'''), 2.54-2.50 (2H, м, CH ₂), 2.01-1.97 (1H, м, H _b -5'), 1.68-1.67 (1H, м, H _b -5'''), 1.55-1.53 (2H, м, CH ₂), 1.32-1.30 (2H, м, CH ₂), 0.92-0.91 (3H, м, CH ₃) | 31 |
| 63 | <i>n</i> BuO | 462.1991 [M+Na] ⁺ | 262.4 (11300) | 7.98 (1H, с, 5-NH), 7.12 (1H, м, H-6), 6.93-6.91 (3H, м, H-3'', H-5''), 6.82-6.79 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.16-6.13 (2H, м, H-2', H-2'''), 6.00-5.98 (1H, д, H-3'), 5.80-5.77 (3H, м, H-3''', H-1', H-1'''), 5.60-5.57 (1H, м, H-4'), 4.83-4.81 (1H, м, H-4'''), 4.71 (1H, с, OH'), 4.30 (1H, с, OH'''), 3.92-3.90 (2H, м, CH ₂), 2.80-2.79 (2H, м, H _a -5', H _a -5'''), 2.0-1.97 (1H, м, H _b -5'), 1.65-1.64 (2H, м, CH ₂), 1.63-1.61 (1H, м, H _b -5'''), 1.47-1.46 (2H, м, CH ₂), 0.97-0.94 (3H, м, CH ₃) | 38 |
| 64 | C ₆ H ₅ O | 482.1680 [M+Na] ⁺ | 265.0 (21870), 333.0 (6700) | 7.29 (2H, м, H-3Ph, H-5Ph), 7.24 (1H, с, H-6), 7.04-7.02 (1H, м, H-4Ph), 6.93 (6H, м, H-2Ph, H-6Ph, H-2'', H-3'', H-5'' H-6''), 6.19-6.18 (1H, д, J=5.52 Гц, H-2'), 6.14-6.13 (1H, д, J=5.51 Гц, H-2'''), 6.00 (1H, м, H-1'), 5.98 (1H, м, H-1'''), 5.83-5.81 (1H, д, J=5.50 Гц, H-3'), 5.77-5.76 (1H, д, J=5.51 Гц, H-3'''), 5.65-5.62 (1H, м, H-4'), 4.84-4.83 (1H, м, H-4'''), 4.73 (1H, с, OH'), 4.28 (1H, с, OH'''), 2.83-2.79 (2H, м, H _a -5', H _a -5'''), 2.01-1.97 (1H, м, H _b -5'), 1.67-1.63 (1H, м, H _b -5') | 40 |

Таким образом, 5-ариламинопроизводные 5'-норкарбоциклического 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина не показали заметной анти-ВИЧ активности, однако все же обладают определенным сродством к ОТ ВИЧ-1, K_i для соединения **59** составляет 119 мкМ. Структурное подобие соединений такого типа многим высокоактивным противовирусным агентам ненуклеозидной природы, используемым для лечения ВИЧ-инфекции, в качестве важнейших компонентов комплексной высокоинтенсивной антиретровирусной терапии[150], делает их интересными для дальнейших модификаций.

Мы впервые обнаружили способность неизвестных ранее 5-ариламинопроизводных 5'-норкарбоциклического 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроуридина задерживать рост *M.tuberculosis*, что открыло новые возможности для поиска новых противотуберкулезных агентов.

2.1.2.3. 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 населения 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. Лица, инфицированные ВИЧ, имеют повышенный риск развития туберкулеза, а заболевшие туберкулезом ВИЧ-инфицированные больные имеют высокий риск смерти[251]. Совокупность этих факторов делает необходимым поиск новых противотуберкулезных агентов. 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[252].

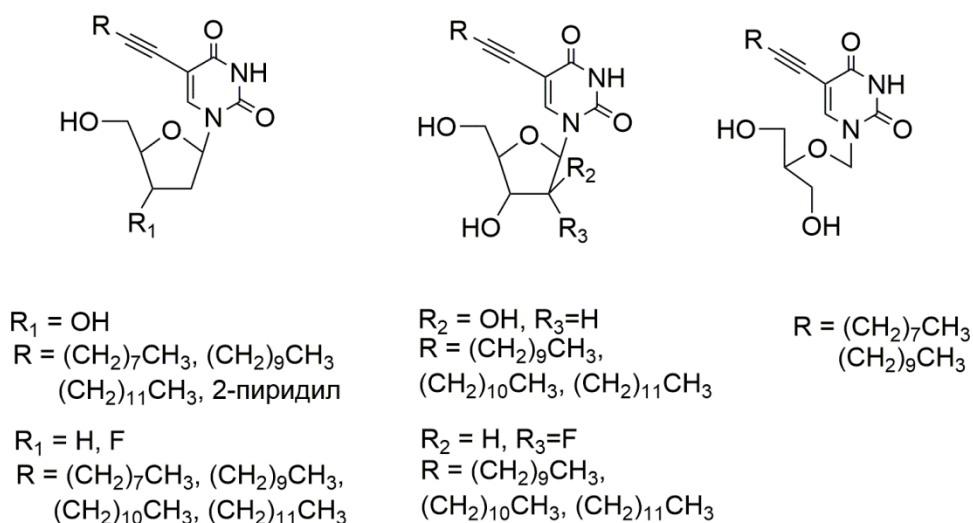


Рисунок 9. 5-Замещенные пиримидиновые аналоги нуклеозидов

Сравнительно недавно появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов. Алкинильные, 5-фенилалкинильные, 5-пиридиналкинильные пиримидиновые нуклеозиды, а также 5-замещенные ациклические пиримидиновые нуклеозиды проверяли в качестве ингибиторов *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. avium* и некоторые проявили заметные противотуберкулезные свойства[253-257]. Наилучшую активность (MIC₉₀ 1-10 мкг/мл) показали производные 5-алкинилзамещенного урацила, а именно 5-децинил, 5-додецинил, 5-тетрадецинил, 5-пиридилэтинил (Рис. 9). При этом аналоги уридина содержали различные модификации сахарного фрагмента. К сожалению, до настоящего времени механизм действия подобных соединений остается невыясненным[252, 256-258]. Как указывалось выше, структура 5'-норкарбоциклических производных нуклеозидов исключает их фосфорилирование клеточными ферментами, поэтому наличие у них противотуберкулезной активности может дать определенную информацию о возможном механизме их действия.

Этот раздел диссертационной работы посвящен синтезу новых 5-замещенных производных урацила, содержащих гидроксциклопентен вместо углеводного фрагмента.

На первом этапе 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[259]. Исходным соединением в этих синтезах был неизвестный ранее карбоциклический нуклеозид 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил **65**, который получали конденсацией Троста[260], исходя из 5-йодурацила и эпоксициклопентена. Далее йод в соединении **65** замещали на алкинильные радикалы реакцией кросс-сочетания Соногаширы[261] в присутствии каталитического количества Pd(PPh₃)₄ и йодида меди (CuI) (Схема 11). Реакцию проводили в ДМФА, при комнатной температуре, в токе Ar. Через 4 часа реакцию останавливали, добавляя 0.5 М раствор ЭДТА.

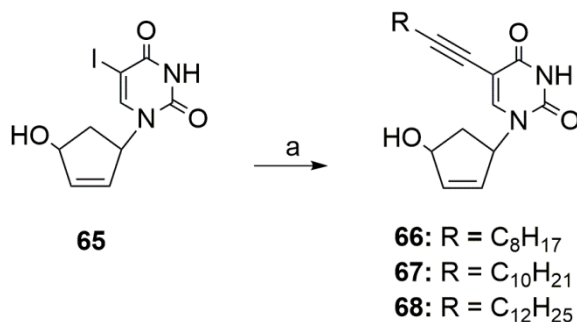


Схема 11. (a) HC≡CR, CuI, NEt(*i*Pr)₂, Pd(PPh₃)₄, ДМФА

Помимо целевых 5-алкинил замещенных производных **66-68**, из реакционной массы были выделены продукты 3,5-бис-присоединения **69-71**, а также бициклические соединения **72-74**. (Рис. 10), которые также были охарактеризованы. Впоследствии были синтезированны бициклические пирроло- и фурано [2,3-d] пиримидины с разными заместителями R в гетероциклическом кольце, некоторые из них проявили ингибирующую активность по отношению к ряду опухолевых клеток с умеренным значением индекса селективности[262].

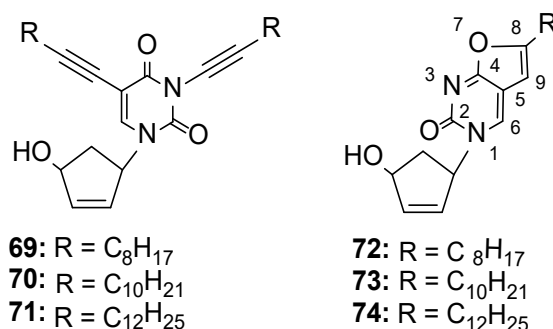


Рисунок 10. 3,5-Бисзамещенные и бициклические производные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила

Подвижность 5-алкинилзамещенных производных **66-68** и побочных продуктов **69-71**, **72-74** на силикагеле различалась, что было отмечено при проведении ТСХ в системах CHCl₃-MeOH (9:1) и EtOAc-MeOH (4:1). Это свойство в дальнейшем было использовано при выделении и очистке целевых продуктов колоночной хроматографией.

Выход продуктов **66-68** составлял 24-32%, продуктов 3,5-бис присоединения **69-71** и бициклических соединений **72-74** – 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. В таблице 8 приведены фрагменты ¹H ЯМР спектров, подтверждающие структуры и положения введенных заместителей.

В ¹H-ЯМР спектрах продуктов бис-присоединения **69-71** наблюдали удвоение интегралов сигналов, соответствующих протонам протяженного алкинильного радикала в области 1-3 м.д. и отсутствие сигнала протона Н-3 в области 8-9 м.д. В случае фуropyримидинов **72-74** появлялся характерный сигнал протона Н-9 при 6 м.д., между сигналами протонов Н-2' и Н-3' циклопентена и отсутствовал сигнал протона Н-3 в области 8.5-10 м.д.

Таблица 8. Физико-химические свойства и выход соединений **66-74**.

| № | R | Тпл. °C | УФ λ max, (ε) | Фрагменты ^1H ЯМР спектров (400 МГц, δ м.д.) | Выход, % |
|-----------|---|-------------|------------------------------------|---|-------------|
| 66 | 5-C ₈ H ₁₇ | 135.5-137 | 297.1 (10200) | 1.58 (2H, м, CH _{2α}), 1.54-1.4 (3H, м, CH _{2β} , H _{b5'}), 1.31-1.3 (2H, м, CH _{2γ}), 1.18 (8H, с, (CH ₂) ₄), 0.81 (3H, м, CH ₃). | 32 |
| 67 | 5-C ₁₀ H ₂₁ | 138-139.5 | 296.9 (10400) | 2.41-2.39 (2H, м, CH _{2α}), 1.53-1.49 (2H, м, CH _{2β}), 1.41-1.39 (2H, м, CH _{2γ}), 1.30 (12H, с, (CH ₂) ₆), 0.92-0.89 (3H, м, CH ₃). | 28 |
| 68 | 5-C ₁₂ H ₂₅ | 143-144 | 297.6 (9900) | 2.36-2.32 (2H, м, CH _{2α}), 1.49-1.45 (2H, м, CH _{2β}), 1.24 (18H, с, (CH ₂) ₉), 0.87-0.83 (3H, м, CH ₃). | 24 |
| 69 | 3,5-(C ₈ H ₁₇) ₂ | - | 342.2 (6200) | 2.65-2.63 (2H, м, N-CH _{2α}), 2.37-2.33 (2H, м, C-CH _{2α}), 1.65-1.63 (2H, м, N-CH _{2β}), 1.53-1.51 (2H, м, C-CH _{2β}), 1.38-1.36 (4H, м, 2×CH _{2γ}), 1.34-1.24 (16H, м, 2×(CH ₂) ₄), 0.88 (6H, м, 2×CH ₃). | 16 |
| 70 | 3,5-(C ₁₀ H ₂₁) ₂ | - | 342 (6500) | 2.83-2.78 (2H, м, N-CH _{2α}), 2.45-2.4 (2H, м, C-CH _{2α}), 1.76-1.74 (2H, м, N-CH _{2β}), 1.61-1.57 (2H, м, C-CH _{2β}), 1.44-1.23 (28H, м, 2×(CH ₂) ₇), 0.84 (6H, м, 2×CH ₃). | 17 |
| 71 | 3,5-(C ₁₂ H ₂₅) ₂ | - | 342.2 (6300) | 2.67-2.63 (2H, м, N-CH _{2α}), 2.37-2.33 (2H, м, C-CH _{2α}), 1.65-1.63 (2H, м, N-CH _{2β}), 1.55-1.54 (2H, м, C-CH _{2β}), 1.51-1.18 (36H, м, 2×(CH ₂) ₉), 0.81 (6H, м, 2×CH ₃). | 17 |
| 72 | фууро-8-C ₈ H ₁₇ | 164-165.5 | 335.6 (5000) 246.1 (8400) | 6.06 (1 H, с H ₉), 2.63-2.59 (2H, м, CH _{2α}), 1.65 (1H, м, H _{b5'}), 1.60-1.58 (2H, м, CH _{2β}), 1.25 (10H, с, (CH ₂) ₅), 0.86 (3H, м, CH ₃). | 13 |
| 73 | фууро-8-C ₁₀ H ₂₁ | 166-168 | 335.9 (5400) 245.6 (9000) | 6.01 (1 H, с, H ₉), 2.57-2.53 (2H, м, CH _{2α}), 1.61 (1H, м, H _{b5'}), 1.59-1.57 (2H, м, CH _{2β}), 1.19 (14H, с, (CH ₂) ₇), 0.82-0.79 (3H, м, CH ₃). | 15 |
| 74 | фууро-8-C ₁₂ H ₂₅ | 156.5-158.5 | 335.4 (5400) 245.7 (8900) | 6.0 (1 H, с, H ₉), 2.55-2.54 (2H, м, CH _{2α}), 1.61 (1H, м, H _{b5'}), 1.60-1.58 (2H, м, CH _{2β}), 1.18 (18H, с, (CH ₂) ₉), 0.80 (3H, м, CH ₃). | 13 |

Побочные продукты заметно отличались по спектру поглощения в ультрафиолете, характерное свечение можно было наблюдать на ТСХ пластинках. В УФ спектрах, на графиках зависимости интенсивности поглощения (Abs.) от длины волны (λ) для продуктов **66-68** максимум поглощения наблюдался при λ 296-297 нм, тогда как соединения **69-71** поглощали УФ при λ 340-345 нм. Для фууропиримидинов **72-74** 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. 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[262].

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 **75-80**) и алкилтриазилодметильные (соединения **81-86**) остатки (схема 12).

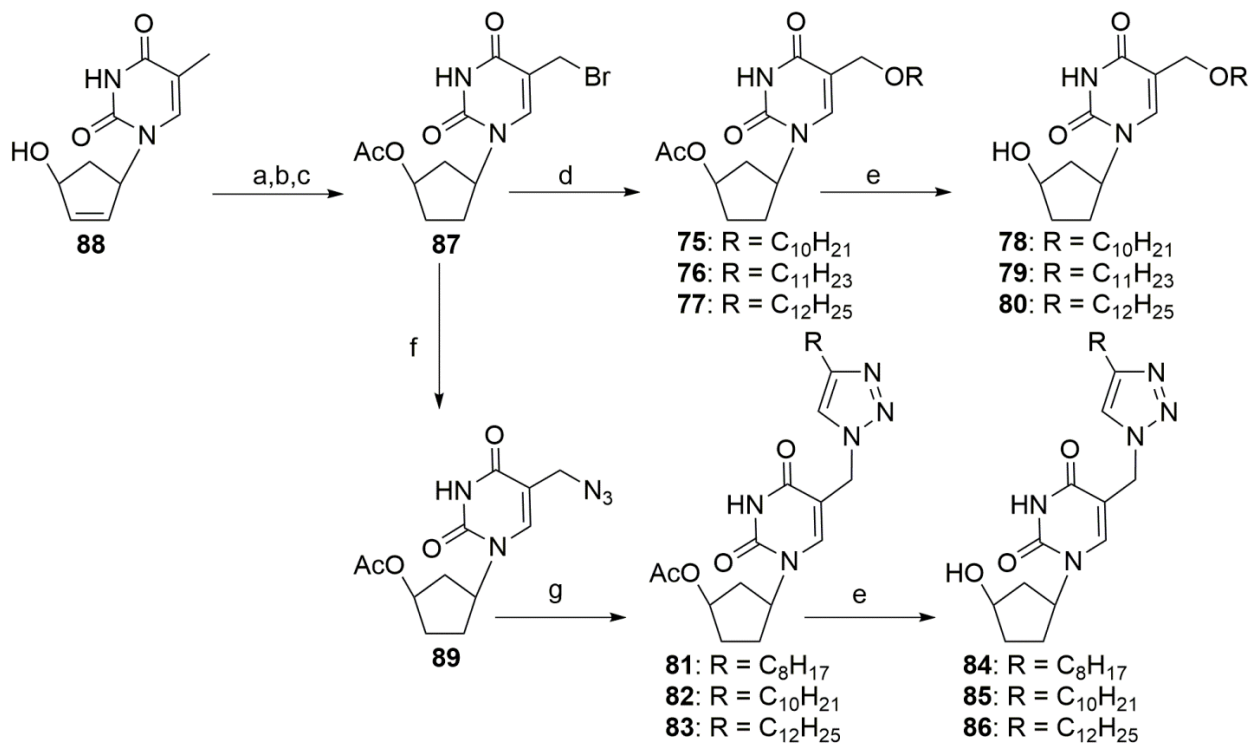


Схема 12. (a) Pd/C, H₂, MeOH; (b) Ac₂O, Py; (c) Br₂, дихлорэтан, *hν*, 83°C; (d) ROH; (e) K₂CO₃, MeOH; (f) NaN₃, ДМФА, 40°C; (g) RC≡CH, CuSO₄·5H₂O, аскорбинат натрия, CH₂Cl₂/H₂O (1:1)

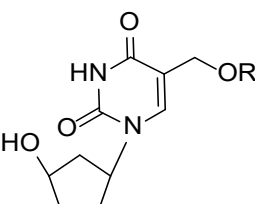
Ключевым промежуточным соединением для синтеза обеих групп новых 5-модифицированных 5'-норкарбоциклических аналогов был 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацил **87** (схема 12). Его синтезировали в три стадии: гидрирование двойной связи соединения **88** в присутствии палладия на угле и последующее ацетилирование приводили к образованию 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)тимина, который подвергали радикальному бромированию по методу Барвольфа и Лангена[263]. Ацетилированные 5-

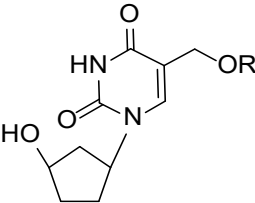
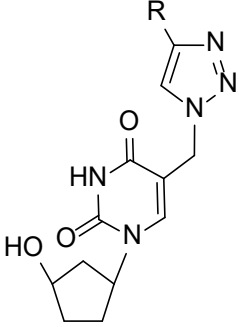
алкилоксиметилзамещенные производные **75-77** получали путем реакции бромида **87** с соответствующим первичным спиртом[264], а последующее снятие защиты с 4'-гидроксигруппы приводило к соединениям **78-80** (таблица 9).

5-Алкилтриазиолометильные производные **81-86** синтезировали по методу Ли[265]. Азидирование 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацила **87** до 5-метилазида **89** 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 **81-83**; после удаления ацетильного остатка с 4'-гидроксигруппы получали целевые 5-алкилтриазиолометильные производные **84-86**.

Структуры неизвестных ранее 5-алкилоксиметильных (соединения **78-80**) и 5-алкилтриазиолометильных (соединения **84-86**) производных 5'-норкарбоциклического аналога 2',3'-дидезоксиуридина были подтверждены методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии, чистота – методом ТСХ. В ^1H -ЯМР спектрах присутствовали все сигналы, характерные для карбоциклического фрагмента, пиримидинового основания и заместителей в 5-ом положении пиримидинового цикла. В таблице 9 приведены сигналы ^1H ЯМР спектров, подтверждающие структуру и положение введенных заместителей, и выходы целевых соединений.

Таблица 9. Физико-химические свойства и выход соединений **78-80** и **84-86**.

| № | Структура | R | Данные ^1H ЯМР спектров (400 МГц, δ м.д.) | Выход*, % |
|-----------|---|------------------------------|--|--------------|
| 78 |  | $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ | 8.72 (1H, уш с, NH), 7.73 (1H, с, H-6), 5.00-4.92 (1H, м, H-1'), 4.39 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5- CH_2O), 3.50 (2H, т, $J=8$ Гц, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 2.36-2.34 (1H, м, H-a5'), 2.19-2.16 и 1.99 -1.89 (4H, 2м, H-2' и H-3'), 1.77-1.72 (1H, м, H-b5'), 1.60-1.57 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 1.28-1.25 (14H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8.0$ Гц, $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$) | 38 |
| 79 | | $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ | 8.56 (1H, уш с, NH), 7.72 (1H, с, H-6), 4.98-4.94 (1H, м, H-1'), 4.40 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5- CH_2O), 3.50 (2H, т, $J=8$ Гц, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.41-2.33 (2H, м, H-a5', OH), 2.21-2.14, 2.05-1.96, 1.94-1.87 и 1.78-1.75 (4H, 4м, H-2' и H-3'), 1.74-1.69 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.55 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1.29-1.25 (16H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 0.87 (3H, т, $J = 8.0$ Гц, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$) | 41 |

| | | | | |
|----|--|---------------------------------|---|------|
| 80 |  | C ₁₂ H ₂₅ | 8.60 (1H, уш с, NH), 7.72 (1H, с, H-6), 4.97-4.94 (1H, м, H-1'), 4.40 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5-CH ₂ O), 3.50 (2H, т, J=8 Гц, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃), 2.41-2.33 (1H, м, H-a5'), 2.21-2.14, 2.05-1.97, 1.94-1.87 и 1.75 (4H, 4м, H-2' и H-3'), 1.75-1.67 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.55 (2H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃), 1.29-1.25 (18H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃), 0.86 (3H, т, J = 8.0 Гц, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃) | 40 |
| 84 |  | C ₈ H ₁₇ | 9.41 (1H, с, NH), 8.22 (1H, с, H-6), 7.60 (1H, с, Н ^{триазол}), 5.28-5.19 (2H, м, 5-CH ₂ N), 5.13-5.07 (1H, м, H-1'), 4.40 (1H, м, H-4'), 2.67 (2H, т, J = 8.0 Гц, CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃), 2.33-2.25 (1H, м, H-a5'), 2.23-2.19, 1.98-1.84 и 1.67-1.64 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.74-1.70 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.57 (2H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃), 1.28-1.23 (10H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃), 0.85 (3H, т, J = 8.0 Гц, (CH ₂) ₇ CH ₃) | 43 |
| 85 | | C ₁₀ H ₂₁ | 9.71 (1H, с, NH), 8.17 (1H, с, H-6), 7.54 (1H, с, Н ^{триазол}), 5.24-5.19 (2H, м, 5-CH ₂ N), 5.16-5.06 (1H, м, H-1'), 4.41-4.40 (1H, м, H-4'), 2.63 (2H, т, J = 8.0 Гц, CH ₂ (CH ₂) ₈ CH ₃), 2.34-2.26 (1H, м, H-a5'), 2.23-2.17, 1.91-1.84 и 1.74-1.65 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.77-1.73 (1H, м, H-b5'), 1.64-1.57 (2H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃), 1.28-1.23 (14H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃), 0.85 (3H, т, J = 8.0 Гц, (CH ₂) ₉ CH ₃) | 52 |
| 86 | | C ₁₂ H ₂₅ | 9.02 (1H, с, NH), 8.11 (1H, с, H-6), 7.52 (1H, с, Н ^{триазол}), 5.24-5.20 (2H, м, 5-CH ₂ N), 5.16-5.04 (1H, м, H-1'), 4.42-4.40 (1H, м, H-4'), 2.65 (2H, т, J = 8.0 Гц, CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃), 2.34-2.28 (1H, м, H-a5'), 2.25-2.18, 1.94-1.83 и 1.69-1.66 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.73-1.70 (1H, м, H-b5'), 1.64-1.59 (2H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃), 1.28-1.24 (18H, м, CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃), 0.86 (3H, т, J = 8.0 Гц, (CH ₂) ₁₁ CH ₃) | 45.5 |

* Выходы приведены в расчете на 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацил **87**

5-Замещенные продукты **65-68** и **75-86** были переданы для изучения противотуберкулезной активности в Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН. Изучение влияния препаратов на рост лабораторного чувствительного штамма *M.tuberculosis* H37Rv проводили с помощью автоматической системы детекции роста Bactec MGIT 960. Антимикобактериальное действие препаратов оценивали методом пропорций в формате TB Exist[266]. Антимикобактериальная активность в системе *in vitro* была показана для всех тестируемых соединений. Минимальные концентрации (MIC₉₉),

при которых происходит подавление роста не менее 99% бактериальной популяции штамма H37Rv для наиболее активных соединений представлены в таблице 10.

Таблица 10. 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) |
|----------------|---|--|
| (±)- 65 | 20 | >200 /Vero |
| (±)- 66 | 40 | >125 /Vero |
| (±)- 67 | 20 | >125 /Vero |
| (±)- 68 | 10 | 125 /Vero |
| (±)- 77 | 20 | 20.6 / U-937 |
| (±)- 81 | 50 | 23.7 / U-937 |
| (±)- 82 | 50 | 15.1 / U-937 |
| рифампицин | 1 | >500 |

^a концентрация препарата ингибирующая рост микобактерий на 99%

Как видно из таблицы 10, наименее активным в ряду 5-алкинил замещенных соединений оказалось 5-децинил производное **66**, величина MIC₉₉ составляла 40 мкг/мл, а в концентрации 20 мкг/мл это соединение на 2-3 дня задерживало рост *M.tuberculosis* по сравнению со стандартом. Лучшей антимикобактериальной активностью среди 5-алкилоксиметильных производных **75-80** обладало соединение **77** с ацетильным остатком по 4'-гидроксильной группе и метилоксидодецильным заместителем по 5-положению урацила. В ряду 5-алкилтриазилометильных производных **81-86** значительный ингибирующий эффект продемонстрировали 4'-ацетилированные аналоги **81** (5-октилтриазилометил) и **82** (5-децилтриазилометил). Необходимо отметить, что в отличие от 5-алкинил замещенных соединений, 5-алкоксиметильные и 5-алкилтриазилометильные производные оказались довольно токсичными для клеток. Наилучшую ингибирующую концентрацию в отношении *M.tuberculosis* (H37Rv) в сочетании с низкой токсичностью продемонстрировало соединение **68**, содержащее тетрадецил в 5-ом положении гетероциклического основания, для него при концентрации 10 мкг/мл наблюдалось 100% ингибирование роста микобактерий.

Антибиотическую активность синтезированных соединений **75-86** 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 **77**, **78**, **82** и **85** – 67 мкг/мл; MIC₁₀₀ на штамме VKPM Ac 1339 для **77** и **78** – 67 мкг/мл, а для **82** и **85** – 6.7 мкг/мл), *M.tuberculosis* 25177 (MIC₁₀₀ для **77** – 55 мкг/мл, **82** – 29 мкг/мл, **85** – 52 мкг/мл, **81** – 54 мкг/мл, **83** – 61 мкг/мл, **84** – 97.5 мкг/мл, **86** – 56 мкг/мл) и *M. bovis* (MIC₁₀₀ для **77** – 55 мкг/мл, **82** – 57.5 мкг/мл, **85** – 100 мкг/мл, **81** – 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.

Карбоциклические производные **65-68** и **75-86** были получены в виде рацемических смесей. Известно, что биологические свойства индивидуальных энантиомеров могут отличаться, поэтому рацемическую смесь наиболее активного соединения **68** разделили с помощью кинетической реакции катализируемой липазой на энантиомеры, и изучали их способность ингибировать рост *M.tuberculosis*.

Ферментативные способы получения чистых изомеров являются предпочтительными. Липазы обладают высокой субстратной специфичностью и позволяют осуществлять разделение первичных, вторичных и третичных спиртов алифатической, ароматической или аллильной природы[267, 268]. В случае карбоциклических аналогов нуклеозидов подобный метод можно использовать как для разделения прекурсоров[269, 270], так и для самих карбонуклеозидов[271]. Надо отметить, что 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, несущие вторичную гидроксильную группу, являются лучшими субстратами липаз при кинетическом разрешении изомеров, чем первичные и третичные спирты[268]. В этом случае катализ липазами ориентирован точно на вторичный гидроксил, связанный с ассиметрическим атомом углерода. Низкая энантиоселективность метода в случае первичных спиртов объясняется удаленным расположением ассиметричного центра от сайта ферментативного действия. Кинетическое разрешение третичных спиртов в присутствии липаз ограничено стерическими факторами и низкой реакционной способностью[268].

Разделение изомеров проводили путем переэтерификации в винилацетате с липазой Amano PS[239, 272]. Винилацетат в данном случае используется для обеспечения необратимости реакции[267]. Процесс останавливали, по достижении 50% конверсии, липазу отделяли и продукты выделяли и очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле. В результате получили (+)-1-(4'-ацетокси-2'-циклопентен-

1'-ил)-5-йодурацил **(+)-90** и **(-)-1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил (-)-65** (Схема 13).

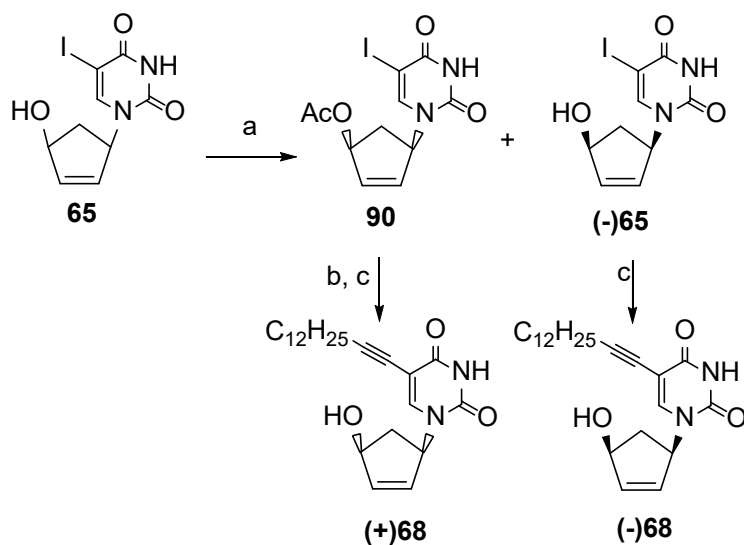


Схема 13. (a) Amano PS липаза, винилацетат; (b) K_2CO_3 , метанол; (c) $HC\equiv C-C_{12}H_{25}$, CuI , $NEt(iPr)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, ДМФА

Ацетильную группу соединения **90** удаляли под действием K_2CO_3 в метаноле и далее проводили реакции замещения йода индивидуальных энантиомеров **(+)-65** и **(-)-65** на тетрадецинил по методу, описанному выше. Выходы продуктов **(+)-68** и **(-)-68** составили 46 и 49% соответственно. Неизвестные ранее изомеры **(+)-65**, **(-)-65**, **(+)-68** и **(-)-68** были охарактеризованы величинами углов вращения плоскополяризованного света $[\alpha]_D$ и с помощью кругового дихроизма (КД).

Соединения **(±)-68**, **(+)-68** и **(-)-68** 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 одновременно к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и пипразинамиду. (Табл. 11)

На штамме H37Rv наибольшую активность показал изомер **(-)-68** с $MIC_{99} = 5$ мкг/мл, тогда как на МЛУ штамме оба изомера и рацемическая смесь проявили одинаковую активность $MIC_{99} = 10$ мкг/мл. MIC_{99} в отношении клинического МЛУ-штамма *M.tuberculosis* MS-115 была также установлена для соединений **77** (20 мкг/мл), **81** (20 мкг/мл) и **82** (50 мкг/мл).

Данные эксперимента показывают, что антимикобактериальная активность полученных соединений **66-68** зависит от длины заместителя в 5-положении. Оказалось, что величина MIC_{99} уменьшается в ряду 5-децинил > 5-додецинил > 5-тетрадецинил.

Таблица 11. Влияние рацемической смеси и энантиомеров соединения **68** на рост лабораторного чувствительного и клинического МЛУ штаммов *M.tuberculosis*

| | <i>M.tuberculosis</i> (H37Rv) | | <i>M.tuberculosis</i> (MS-115) | |
|---------------|--|--|--|--|
| Соединение | % ингибирование ^a (конц. мкг/мл) | МІС ₉₉ ^b (мкг/мл) | % ингибирование ^a (конц. мкг/мл) | МІС ₉₉ ^b (мкг/мл) |
| (±)-68 | 100 (20), 99 (10) | 10 | 100 (20, 10) | 10 |
| (+)-68 | 100 (20, 10), 25 (5) | 10 | 100 (20), 99 (10) | 10 |
| (-)-68 | 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%

Недавно в лаборатории профессора П. Хердвайна было показано, что 5-замещенные монофосфаты 2'-дезоксинуридина способны ингибировать флаavin-зависимую тимидилатсинтазу (Thy-X)[271]. В связи с этим была предложена возможная мишень и механизм действия 5-замещенных производных 2'-дезоксинуридина, который включает их внутриклеточное фосфорилирование с последующим ингибированием Thy-X. Эта гипотеза не объясняет активности 5-алкинильных производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, которые не способны образовывать фосфатные формы под действием клеточных ферментов.[273, 274] По-видимому, существует альтернативный механизм действия 5-замещенных производных 2'-дезоксинуридина и его карбоциклических аналогов.

Данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) морфологии бактериальных клеток *M.tuberculosis* H37Rv, обработанных аналогами **68** и **77** (рис. 14), 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[275]. 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 взаимодействием с клеточными стенками бактерий,

либо с взаимодействиями с ферментами, участвующими в процессе формирования клеточной стенки.

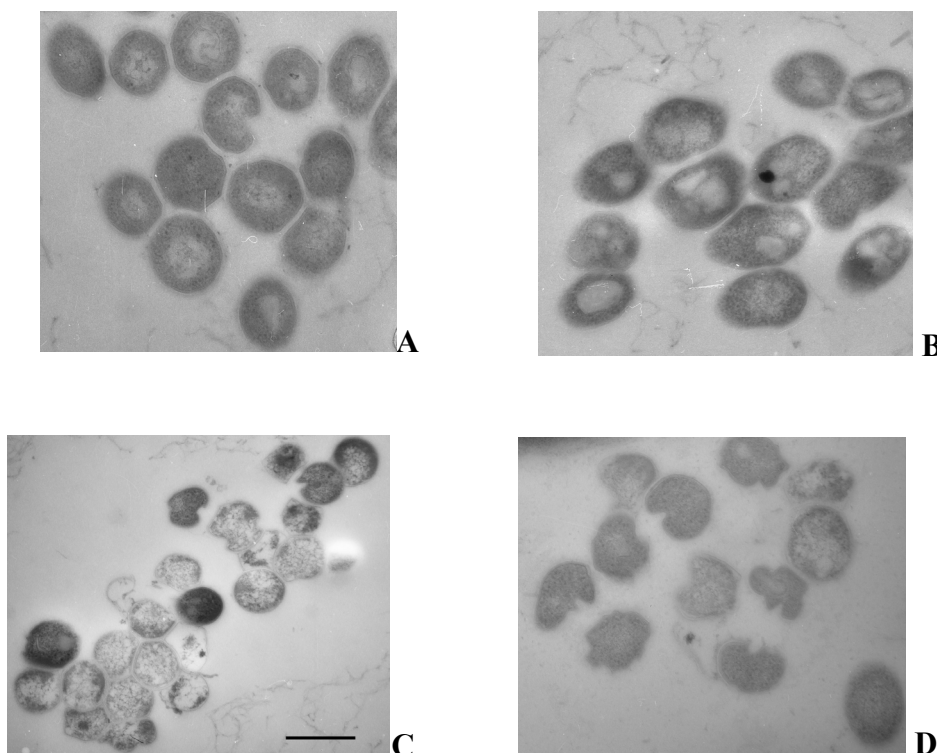


Рисунок 14. Электронные микрофотографии клеток *M.tuberculosis* H37Rv, выращенных в течение 4 дней в обогащенной среде Дюбуа (А), в присутствии буфера ДМСО / Tween-80 / H₂O без соединений (В) и с добавлением соединений 68 (С) и 77(Д) в концентрации 50 мкг/мл.

Заключение по разделу 2.1.2.

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)[145, 241, 247, 250, 275-277] и связываться в гидрофобном «кармане» ОТ ВИЧ-1 (новый механизм действия)[143, 144, 241]. 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.

Выводы по разделу 2.1.

1. Синтезированы неизвестные ранее динуклеозидолигофосфонаты, которые способны сами ингибировать синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой ВИЧ. При гидролизе в сыворотке крови эти динуклеозидолигофосфонаты образуют соответствующие трифосфонаты, являющиеся эффективными терминаторными субстратами обратной транскриптазы ВИЧ.
2. Впервые показана способность 5'-норкарбоциклических производных урацила выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантной формы L100I, соответствующей штамму ВИЧ-1, резистентному к ННИОТ первого поколения (Эфавиренц и др.).
3. Впервые показана противотуберкулезная активность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. Синтезированы неизвестные ранее 5-алкинилпроизводные 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила. Выделены индивидуальные энантиомеры 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадеценилурацила, MIC₉₉ на *M. tuberculosis* H37Rv и MS-115 составила 5-10 мкг/мл.
4. Проведен анализ зависимости биологической активности от структуры синтезированных в 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов; выявлены базовые соединения, а именно (-)-1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадеценилурацил и 1-(4'-бензоил-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил, являющиеся наиболее перспективными для последующих модификаций с целью увеличения активности и понижения токсичности разрабатываемых аналогов нуклеозидов данного типа.

2.2. Депо-формы НИОТ ВИЧ

В настоящий момент группа нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ), 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 (3ТС, ламивудин), (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин (L-FTC, эмрицитабин), (1S,4R)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)-9H-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанол (ABC, абакавир) и производные ([[(2R)-1-(6-амино-9H-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси]метил)фосфоновой кислоты: дизопроксил фумарат или алафенамид (TDF - тенофовир дизопроксил фумарат или TAF - тенофовир алафенамид) (рис. 15)[18]. 2',3'-Дидезоксиинозин (ddI, диданозин) и 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (d₄T, ставудин) входили в эту группу раньше, но сейчас для лечения не используются. Механизм действия нуклеозидных ингибиторов ОТ, как указано выше, включает внутриклеточное трифосфорилирование с последующим специфическим блокированием синтеза вирусной ДНК, катализируемого ОТ ВИЧ.

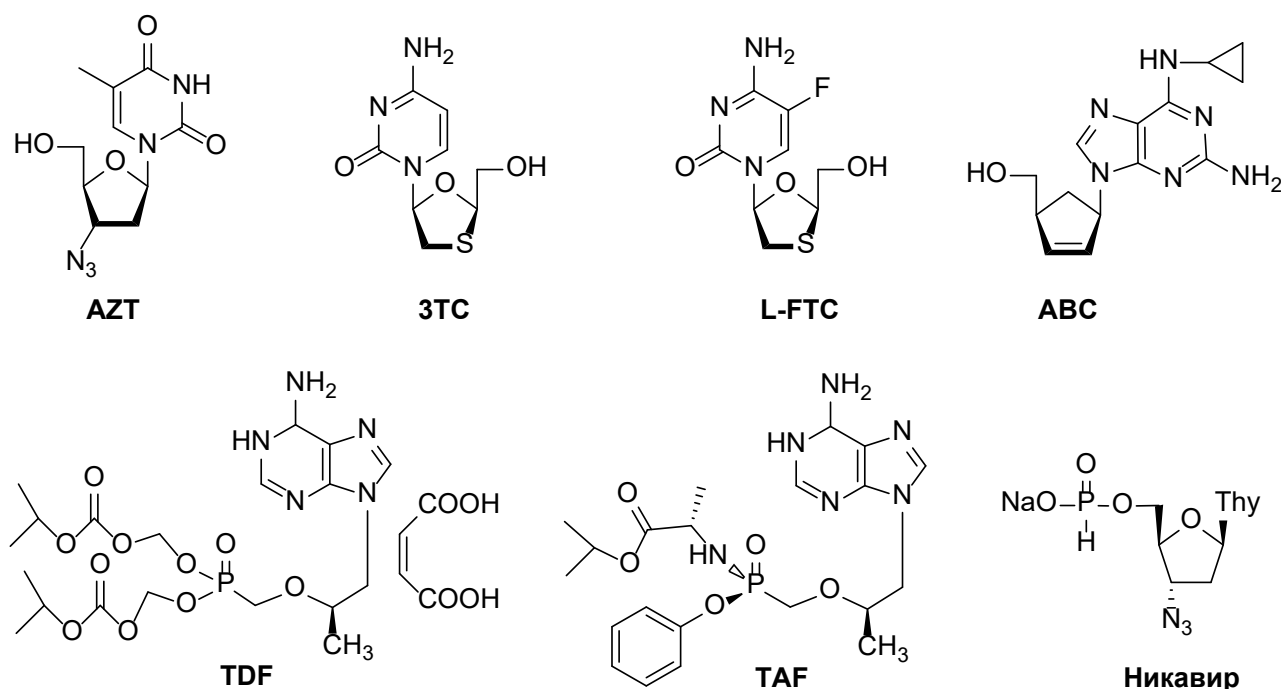


Рисунок 15. Нуклеозидные ингибиторы ОТ ВИЧ

Используемые в настоящее время 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 позволяют контролировать репликацию ВИЧ в большей степени, чем индивидуальные препараты, но и для них нужны новые эффективные и нетоксичные компоненты, поскольку большинство из 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[278, 279], что также снижает эффективность терапии.

Клинические последствия токсичности AZT включают многочисленные гематологические эффекты, подавление функционирования клеток костного мозга, заболевания печени, миопатии и др.[280, 281]. Из-за митохондриальной токсичности AZT больные СПИДом страдают от гиперлактатемии и липодистрофии[282, 283]. Быстрое выведение AZT требует ежедневного трехразового приема препарата. После длительного курса AZT становится неэффективным из-за развития у вируса резистентности к нему[284, 285]. 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[286]. 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)[287, 288] (Рис. 15).

Никавир был лицензирован в Российской Федерации в 1999 году как препарат для лечения больных СПИДом и профилактики ВИЧ-инфекции[3, 4, 289, 290]. 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[3, 291].

5'-Н-Фосфонат AZT синтезировали в 1989 году и проверили на клеточных культурах, инфицированных ВИЧ-1[291], однако результаты тестов, проведенных в различных

лабораториях, значительно отличались[292-296]. Несмотря на эти противоречивые и несколько спорные данные, изучение фосфазида было продолжено, что позволило выявить его преимущества перед AZT в опытах на лабораторных животных[297].

Фармакокинетические исследования фосфазида показали его основное отличие от AZT: фармакокинетический профиль AZT после перорального приема фосфазида был существенно более плавным, чем при приеме самого AZT (C_{\max} и $t_{\max} \sim 0.13$ мг/л и 2 – 2.5 ч соответственно против 1.2 мг/л и 0.5–0.8 ч у AZT). Меньшая пиковая концентрация AZT, наблюдаемая после приема фосфазида, не снижала противовирусную эффективность, но могла способствовать снижению токсичности. Это отличие использовали в клинической практике, где наблюдали устойчивый положительный терапевтический эффект (снижение вирусной нагрузки, восстановление иммунитета и уменьшение опасности развития сопутствующих заболеваний). Фосфазид хорошо переносится взрослыми и детьми. В ходе лечения фосфазидом не было выявлено побочных эффектов, обычно наблюдавшихся при приеме AZT, таких, как рвота, тошнота, головная боль, диарея, миалгия, анемия, тромбоцитопения и нейтроцитопения[3].

Существенная терапевтическая эффективность и безопасность фосфазида отмечена у ВИЧ-инфицированных, получающих ВААРТ. Хорошо показали себя различные сочетания нуклеозидов: с диданозином и невирапином[298], с диданозином и ритонавиром/саквинавиром[299], с ламивудином и эфавиренцем или ингибитором протеазы (атазанавиром или лопинавиром/ритонавиром)[300] и др. Перечисленные схемы ВААРТ оказались более эффективными при сопутствующих заболеваниях – анемиях, хронических гепатитах В и С[301], циррозе печени и туберкулезе[302], чем схемы, включающие ретровир или комбивир. Безопасность нуклеозидов при туберкулезе и заболеваниях печени вирусной этиологии является его существенным преимуществом, потому что большинство пациентов, зараженных ВИЧ, страдают от данных оппортунистических инфекций[301, 302].

Другое клиническое применение фосфазида – химиопрофилактика передачи ВИЧ от инфицированных женщин их детям во время беременности, родового и послеродового периодов. Фосфазид не влияет на течение беременности у ВИЧ-инфицированных женщин, на зрелость и жизнеспособность плодов. AZT из фосфазида эффективно проникает через плаценту, в результате чего в пуповине и крови матери поддерживаются его одинаковые концентрации. Использование нуклеозидов во время беременности в сочетании с ретровиром или невирапином в родах и послеродовом периоде эффективно предотвращает вертикальную передачу ВИЧ[303, 304]. В некоторых случаях ретровир был заменен на

никавир из-за низкого уровня гемоглобина в крови беременных женщин. Во всех случаях препарат хорошо переносился, а гематологические показатели восстанавливались.

Таким образом, низкая токсичность и хорошая переносимость фосфазида 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.

2.2.1. Эфиры 5'-H-фосфонатов AZT и d₄T

2.2.1.1. Синтез эфиров 5'-H-фосфонатов AZT и d₄T

Первая группа потенциальных депо-форм объединяет неизвестные ранее эфиры 5'-H-фосфонатов AZT **91-103** и d₄T **104-110** (рис. 16). Эти незаряженные соединения были получены для улучшения терапевтических свойств, за счет способности проникать в клетку и постепенно высвобождать активный нуклеозид.

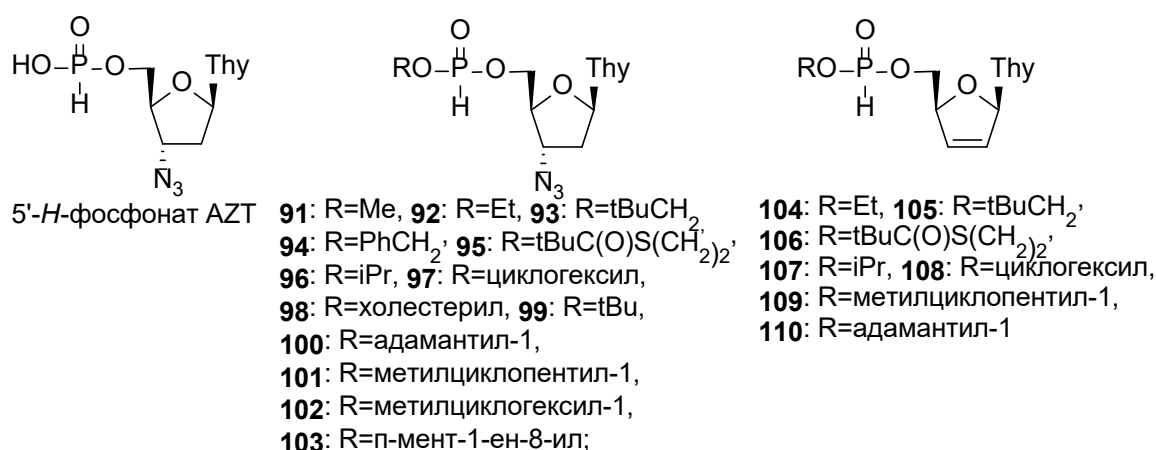


Рисунок 16. Производные H-фосфонатов AZT и d₄T.

Существует несколько способов получения эфиров такого типа. Мы использовали три метода: первый заключался во взаимодействии нуклеозида и алкилфосфодихлоридита[296], полученного *in situ* из трихлорида фосфора и

соответствующего спирта (схема 14А, на примере AZT); второй метод представлял собой конденсацию 5'-*H*-фосфоната нуклеозида и спирта в присутствии пивалоилхлорида[305] (схема 14В, на примере AZT); по третьему методу фосфитилирование нуклеозида проводили с помощью коммерческого дифенилфосфита[306] и, не выделяя промежуточного фенилфосфита нуклеозида, добавляли в реакционную смесь соответствующий спирт (схема 14С, на примере AZT). Первые два метода позволили получить и выделить целевые эфиры **91-103** и **104-110** с высокими выходами (таблица 3). Третий метод оказался менее эффективным: в реакционной смеси кроме целевого диэфира всегда присутствовали 5'-*H*-фосфонат нуклеозида и фенилфосфит.

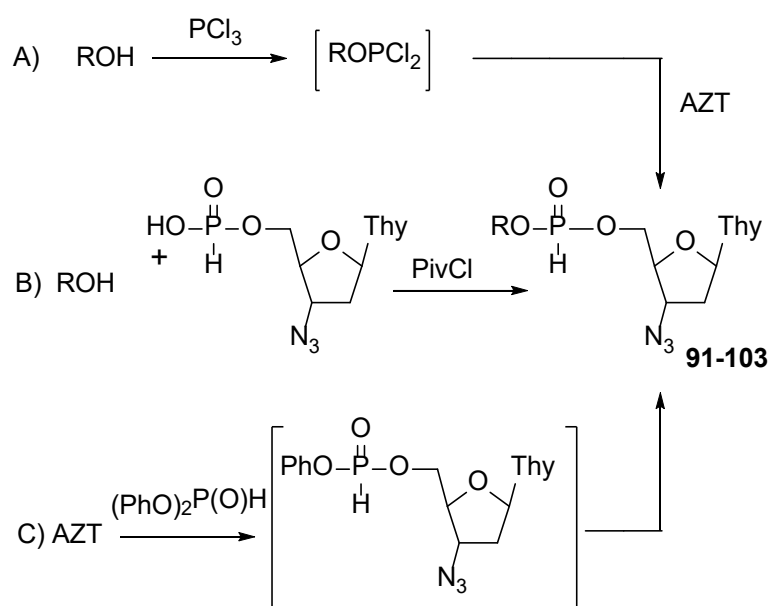


Схема 14. Пути синтеза эфиров 5'-*H*-фосфоната AZT

Для синтеза эфиров **91-103** и **104-110** были использованы первичные, вторичные и третичные спирты, содержащие как электронодонорные, так и электроноакцепторные группы. Следует отметить, что структура введенного остатка сильно влияла на свойства полученных эфиров. Так, эфир *H*-фосфоната AZT, содержащий остаток цианэтанола, оказался весьма неустойчив как в водных растворах, так и на силикагеле, что существенно осложняло его выделение. В случае бензилового эфира удалось выделить лишь 62% продукта **94**, хотя в реакции он получался с количественным выходом (по данным ТСХ). С другой стороны, эфир **98**, включающий остаток холестерина, был выделен с высоким выходом, однако крайне малая растворимость в водных растворах лимитировала изучение его биохимических свойств.

Таблица 12. Выходы и физико-химические свойства эфиров **91-103** и **104-110**.

| Соед | R | Метод | Выход, % | УФ (MeOH) λ_{\max} , нм | m/e, [M] ⁺ | ³¹ P ЯМР, CD ₃ CN, δ , м.д. |
|------------|---|--------|-------------|---------------------------------------|--------------------------|---|
| 91 | Me | A B | 67 48 | 265 | 345.3 | 8.10 с, 7.53 с |
| 92 | Et | B C | 74 7 | 265 | 359.3 | 8.42 с, 7.81 с |
| 93 | <i>t</i> BuCH ₂ | A | 47 | 266 | 401.35 | 9.00 с, 8.35 с |
| 94 | PhCH ₂ | B | 62 | 266 | 421.3 | 8.75 с, 8.23 с |
| 95 | <i>t</i> BuC(O)SCH ₂ CH ₂ | B | 48 | 267 | 475.5 | 9.82 с, 9.36 с |
| 96 | <i>i</i> Pr | B | 84 | 265 | 373.3 | 8.26 с, 7.86 с |
| 97 | циклогексил | A B | 52 62 | 265 | 413.4 | 8.08 с, 7.63 с |
| 98 | холестерил | B | 70 | 265 | 699.9 | 6.94 с, 6.35 с |
| 99 | <i>t</i> Bu | A | 80 | 266 | 387.3 | 3.96 с, 3.62с |
| 100 | адамантил-1 | B | 67 | 266 | 465.9 | 3.36 с, 3.08 с |
| 101 | метилциклопентил-1 | B | 8 | 266 | 413.4 | 3.07 с, 2.68 с |
| 102 | метилциклогексил-1 | B | 15 | 266 | 427.4 | 3.45 с, 3.06 с |
| 103 | <i>n</i> -мент-1-ен-8-ил | B | 18 | 267 | 467.5 | 3.65 с, 3.23 с |
| 104 | Et | A | 54 | 265 | 316.2 | 8.25 с, 7.86 с |
| 105 | <i>t</i> BuCH ₂ | A | 67 | 265 | 358.3 | 8.56 с, 8.43 с |
| 106 | (CH ₃) ₃ CC(O)SCH ₂ CH ₂ | A | 32 | 267 | 432.4 | 9.48 с, 9.39 с |
| 107 | <i>i</i> Pr | A | 58 | 265 | 330.3 | 8.67 с, 7.94 с |
| 108 | циклогексил | A | 76 | 266 | 370.3 | 7.60 с, 7.24 с, |
| 109 | метилциклопентил-1 | A | 8 | 266 | 370.3 | 2.28 с, 1.88 с |
| 110 | адамантил-1 | A B | 79 84 | 265 | 422.4 | 2.92 с, 2.05 с |

Структуры соединений **91-103** и **104-110** были подтверждены УФ, масс-, ¹H-ЯМР и ³¹P-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[296]. ³¹P-ЯМР спектры содержали два набора сигналов, соответствующие смеси диастереомеров ~1:1. При подавлении фосфор-протонного взаимодействия эти сигналы превращались в два синглета (см. таблицу 12).

2.2.1.2 Сравнительная оценка химической стабильности производных *H*-фосфоната AZT

Стабильность синтезированных соединений **91-103** была изучена в фосфатном буфере при pH 7.5 (см. таблицу 13). Состав смеси и количество продуктов гидролиза анализировали методом ТСХ. Было показано, что продуктом гидролиза эфиров, содержащих остатки первичных и вторичных спиртов (**91-93**, **96-97**) является AZT, а из производных третичных спиртов (**99-100**), образуется 5'-*H*-фосфонат азидотимидина. В результате гидролиза бензилового эфира **94** были получены оба продукта: 70% AZT и 30% 5'-*H*-фосфоната азидотимидина. Время гидролиза половинного количества эфиров **91-103** колеблется от 30 минут (*трет*-бутиловый эфир **99**) до 18 часов (неопентиловый эфир **93**).

Гидролиз в сыворотке крови человека приводил к образованию тех же продуктов, но протекал еще быстрее (см. таблицу 13)[307].

Таблица 13. Стабильность эфиров *H*-фосфоната AZT

| Соединение | Время гидролиза половинного количества соединения | | Продукты гидролиза |
|------------------------------|---|-----------------|------------------------------------|
| | pH 7.5 | сыворотка крови | |
| 91 | 1 ч | 2 мин | AZT |
| 92 | 1 ч | 15 мин | AZT |
| 93 | 18 ч | 2 ч | AZT |
| 94 | 1.5 ч | 0.5 ч | AZT : <i>H</i> -фосфонат AZT (7:3) |
| 96 | 7 ч | 1 ч | AZT |
| 97 | 8 ч | 3 ч | AZT |
| 99 | 0.5 ч | 5 мин | <i>H</i> -фосфонат AZT |
| 100 | 1.5 ч | 0.5 ч | <i>H</i> -фосфонат AZT |
| <i>H</i>-фосфонат AZT | 240 ч | 50 ч | AZT |

Таким образом, показано, что направление и скорость гидролиза эфиров **91-103** зависят от природы заместителя и от свойств уходящей группы, однако даже для наиболее стабильного соединения **97** время гидролиза половинного количества в сыворотке крови человека составило всего 3 часа. Производные *H*-фосфоната d₄T **104-110** были примерно вдвое устойчивее к химическому и ферментативному гидролизу, чем соответствующие полные эфиры *H*-фосфоната AZT.

2.2.1.3 Анти-ВИЧ активность производных *H*-фосфонатов AZT и *d*₄T

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[307-309]. 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 = Me, Et, Me₃CCH₂, PhCH₂, *i*-Pr, cyclohexyl, cholesteryl, *t*-Bu, Ada) показали значительную активность в этих клетках, превышающую активность контрольного AZT в 20-30 раз[310]. В то же время токсичность этих соединений была близка к токсичности *H*-фосфоната AZT. Эфиры *H*-фосфонатов *d*₄T **104-110** также имели преимущества как по сравнению с самим *d*₄T, так и по сравнению с его *H*-фосфонатом[310].

Следует отметить, что одинаковые модификации разных нуклеозидов вызывали различный эффект. Так, в серии AZT наиболее активным соединением оказался циклогексиловый эфир **97**, причем его антивирусный эффект превосходил таковой для AZT на два порядка, а для производных *d*₄T наиболее активными были неопентиловый, изопропиловый и адамантиловый эфиры **105, 107** и **110**.

Таким образом, синтезированные нами эфиры обладают хорошими антивирусными 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.

2.2.2. Производные фосфоноформиатов AZT и *d*₄T

2.2.2.1 Синтез производных фосфоноформиатов AZT и *d*₄T

К другому типу фосфорилированных нуклеозидов относится 5'-фосфоноформинат **111a** (рис.17), который был синтезирован ранее[311] 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[312]. 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[313]. Однако различие в эффективных антивирусных концентрациях AZT и PFA в клеточных культурах составляет 2-3 порядка[312]. 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.

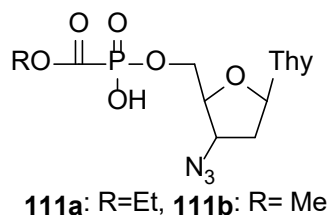


Рисунок 17. Заряженные эфиры фосфоноформиата AZT

Мы решили модифицировать фосфоноформиатные 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 фосфоноформиатов AZT **112-117** и d₄T **118-119** (рис. 18)[314-316].

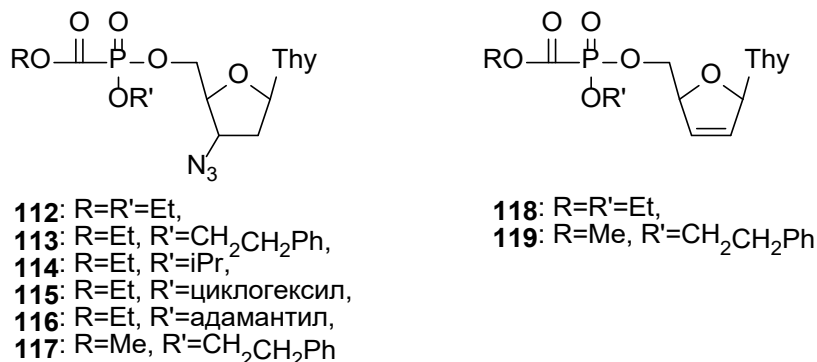


Рисунок 18. Незаряженные эфиры фосфоноформиатов AZT и d₄T

Синтез эфиров **112** и **118** осуществляли обработкой коммерческого триэтилфосфоноформиата пятихлористым фосфором или тионилхлоридом и последующим прибавлением нуклеозида (AZT для **112** или d₄T для **118**) к полученному *in situ* хлорангидриду этил(этоксикарбонил)фосфоновой кислоты (схема 15A). Целевые продукты **112** и **118** были выделены методом колоночной хроматографии на силикагеле (хлороформ-метанол 95:5) с выходами 73% и 65%, соответственно (таблица 14).

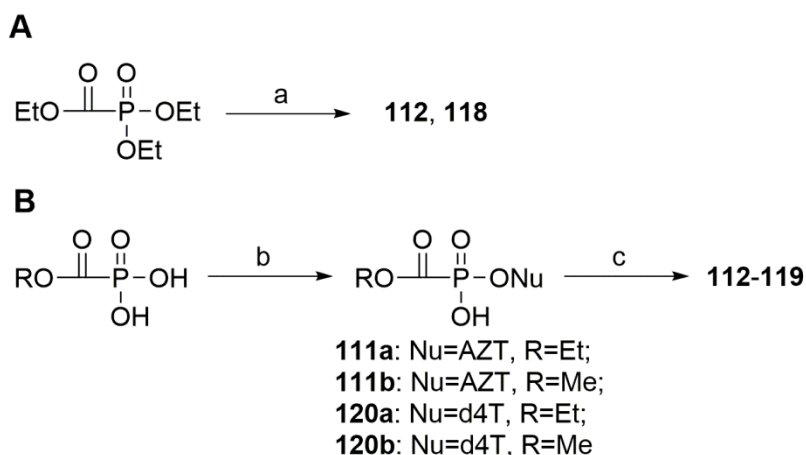


Схема 15. (a) 1) PCl₅ 2) NuH (AZT для **112** или d₄T для **118**); (b) NuH (AZT для **111a,b** или d₄T для **120a,b**), ДЦК; (c) TPSCl, R'OH

Второй способ получения эфиров типа **112-119** заключался в конденсации фосфоноформиатов **111a,b** или **120a,b** с соответствующим спиртом в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPSCl) (схема 15B). Исходные фосфонаты **111a,b** и **120a,b** синтезировали взаимодействием нуклеозида (AZT для **111a,b** или d₄T для **120a,b**) и алкоксикарбонилфосфоновой кислоты в присутствии ДЦК с выходами ~60%.

Неизвестные ранее целевые эфиры фосфонатов **112-119** были выделены колоночной хроматографией на силикагеле с выходами ~30-60% и охарактеризованы УФ, масс-, ¹H-ЯМР и ³¹P-ЯМР спектрами. Благодаря появлению ассиметрии при атоме фосфора, соединения **112-119** 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 (таблица 14).

Мы также предприняли попытку получить эфиры типа **112**, содержащие другие заместители по карбоксильной группе (неопентил, изопропил, циклогексил), т.е.

осуществить переэтерификацию эфиров типа **112** и **111a** соответствующими спиртами в присутствии гидрида натрия. Однако основными продуктами таких реакций были *H*-фосфонат AZT (в случае фосфоната **111a**) или соответствующие эфиры *H*-фосфоната AZT **93**, **96**, **97** (в случае фосфоната **112**), т.е. под действием NaN происходило расщепление сложноэфирной -C(O)-OR связи, образование Na-соли карбоксифосфоната и декарбоксилирование.

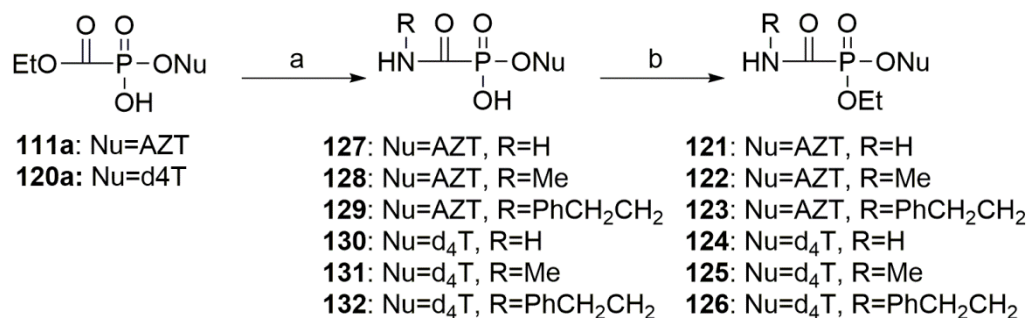


Схема 16. (a) RNH₂; (b) TPSCl, EtOH

Другой группой синтезированных нами фосфоноформатных производных AZT и d₄T были неизвестные ранее аминокарбонилфосфонаты **121-123** и **124-126**[314]. Амиды **121-126** получали аммонолизом фосфонатов **111** или **119** под действием первичных аминов (25% водного аммиака, 25% водного метиламина или фенилэтиламина) и последующей реакцией полученных заряженных амидов **127-132** с этанолом в присутствии TPSCl (схема 16). При большом избытке амина реакции аммонолиза проходили практически количественно. В последующей конденсации с этанолом амиды **127-128** и **130-131** после удаления избытка исходного амина в вакууме водоструйного насоса использовали без очистки, а фенилэтиламиды **129** и **132** выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl. Реакция аммонолиза фосфоната **111a** 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; их физико-химические характеристики приведены в таблице 14.

Таким образом, синтезированы неизвестные ранее *P*-алкильные эфиры фосфоноформатных производных AZT и d₄T, а также *P*-алкильные эфиры аминокарбонилфосфонатов AZT и d₄T, содержащие набор различных алкоксильных заместителей при атоме фосфора.

Таблица 14. Выходы и физико-химические свойства производных фосфоноформиатов AZT и d₄T.

| Соединение | | Выход, % | УФ MeOH λ_{\max} , нм | m/e, [M] ⁺ | ³¹ P ЯМР, CD ₃ CN, δ , м.д. |
|--|---|-------------|-------------------------------------|--------------------------|---|
| $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{RO}-\text{C}-\text{P}-\text{OAZT} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{OR}' \end{array}$ | 112: R=R'=Et | 73 | 267 | 431.3 | -4.04 с, -4.38с |
| | 113: R=Et, R'=PhCH ₂ CH ₂ | 53 | 266 | 507.4 | -4.13 с, -4.32 с |
| | 114: R=Et, R'=iPr | 40 | 267 | 445.4 | -4.53 с, -4.70 с |
| | 115: R=Et, R'=циклогексил | 54 | 266 | 485.4 | -4.98 с, -5.33 с |
| | 116: R=Et, R'=адамантил | 28 | 265 | 537.5 | -8.68 с, -9.13 с |
| | 117: R=Me, R'=PhCH ₂ CH ₂ | 61 | 266 | 493.4 | -4.25 с, -4,45 |
| $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{RO}-\text{C}-\text{P}-\text{Od}_4\text{T} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{OR}' \end{array}$ | 118: R=R'=Et | 65 | 267 | 388.3 | -3.56 с, -3.85 с |
| | 119: R=Me, R'=PhCH ₂ CH ₂ | 58 | 267 | 450.4 | -3.78 с, -3.94 с |
| $\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HN}-\text{C}-\text{P}-\text{OAZT} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{OEt} \end{array}$ | 121: R=H | 72 | 266 | 402.3 | -0.12 с, -0.38 с |
| | 122: R=Me | 64 | 265 | 416.3 | -0.10 с, -0.54 с |
| | 123: R=PhCH ₂ CH ₂ | 70 | 266 | 506.5 | 0.04 с, -0.40 с |
| $\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HN}-\text{C}-\text{P}-\text{Od}_4\text{T} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{OEt} \end{array}$ | 124: R=H | 42 | 266 | 359.3 | 0.15 с, -0.12 с |
| | 125: R=Me | 48 | 267 | 373.3 | -0.27 с, -0.76 с |
| | 126: R=PhCH ₂ CH ₂ | 72 | 267 | 463.2 | -2.39 с, -3.00 с |

2.2.2.2 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 **112-117** и **118-119** наиболее активны и наименее токсичны (алкил)этоксикарбонилфосфонаты **112**, **113**, **118** и **117**, содержащие при атоме фосфора первичный алкил (этильную или фенэтильную группу)[317, 318]. 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 таковой для соответствующих нуклеозидов и заряженных производных фосфоноформиаатов типа **111**. Токсичность большинства соединений была ниже, чем у контрольных AZT и d₄T, однако производные **114** и **115**, 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 **116**, с третичным остатком адамантила, было нетоксичным, но и по активности существенно проигрывало. Незаряженные 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT **121-123** также показали высокую активность (ED₅₀ 0.2-9 нМ) при низкой токсичности (CD₅₀ 113-250 мкМ). Соответствующие производные d₄T **124-126** 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 (ED₅₀ 240 нМ, CD₅₀ 314 мкМ, SI 1308)[319].

Таким образом, клеточные эксперименты с 5'-этоксикарбонилфосфонатами и 5'-аминокарбонилфосфонатами AZT и d₄T оказались результативными: полные эфиры эффективно подавляли репродукцию вируса иммунодефицита человека 1-го типа в культуре перевиваемых лимфоцитов МТ-4, обеспечивали защиту клеток от цитопатогенного действия вируса и не проявили токсичности в отношении хозяйских клеток [314, 318].

2.2.2.3. Стабильность производных фосфоноформиаатов 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.

Время химического гидролиза половинного количества полных эфиров фосфоноформиаатов в фосфатном буфере (рН 7,2) составило 10 мин для производного AZT **112** и 30 мин для соответствующего эфира d₄T **118**. Замена эфирной группы у атома фосфора с этильного остатка на фенилэтильный (**113**) или изопропиловый (**114**) фрагмент приводила к небольшому повышению стабильности (T_{1/2} 40-60 мин). 5'-Аминокарбонилфосфонаты **121-126** 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 **121**. Время полугидролиза соединения **121** 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 **121-123** время полугидролиза в фосфатном буфере при рН 7.2 составило 2,5 ч для **121**, 6 ч для **122** и более 10 ч для **123**. Однако даже самые химически стабильные производные фосфоноформиатов оказались неустойчивыми к ферментативному гидролизу в сыворотке крови. Например, время полугидролиза соединения **121** в сыворотке крови при 37°C не превышало 7 мин, а для производного d_4T **124** – 21 мин. Соединения, содержащие d_4T , 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 **112-126**, как и в случае с полными эфирами *H*-фосфонатов **91-110**, не позволила продолжать исследования.

2.2.3. Производные фосфоноацетатов AZT и d_4T

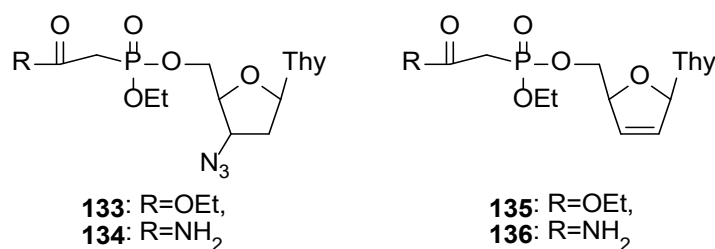


Рисунок 19. Производные фосфоноацетатов AZT и d_4T

Для повышения стабильности потенциальных депо-форм AZT и d_4T были получены эфиры фосфоноацетатов **133-136** (рис.19).

Синтезировали соединения **133-136** аналогично соответствующим производным фосфоноформиатов исходя из триэтилфосфоацетата, выделяли и очищали как описано выше. Синтез на примере производных d_4T приведен на схеме 17.

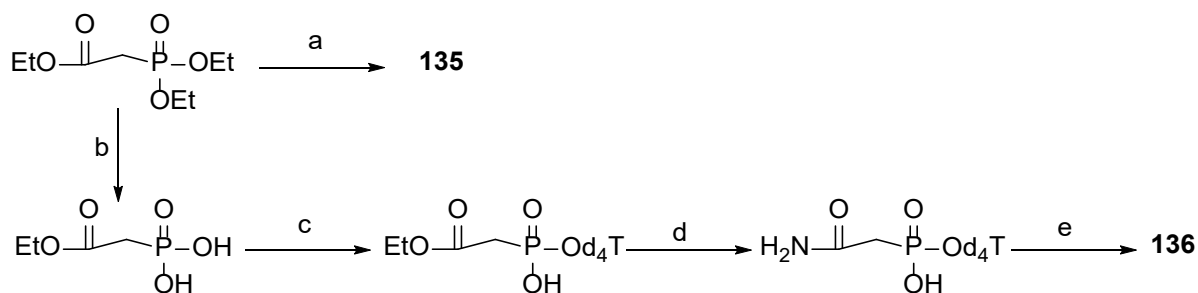


Схема 17. (a) 1) PCl_5 2) d_4T ; (b) Me_3SiBr ; (c) d_4T , ДЦК; (d) $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$; (e) TPSCl , EtOH

Таблица 15. Выходы и физико-химические свойства производных фосфоацетатов AZT и d₄T.

| Соединение | Выход, % | УФ MeOH, λ_{max} , нм | m/e, [M] ⁺ | ³¹ P ЯМР, CD ₃ CN, δ , м.д. |
|------------|----------|--------------------------------------|-----------------------|--|
| 133 | 72 | 267 | 445.1 | 22.44 с, 20.82 с |
| 134 | 77 | 266 | 416.1 | 24.36 с, 24.03 с |
| 135 | 67 | 267 | 402.1 | 21.21 с, 21.03 с |
| 136 | 67 | 266 | 373.1 | 25.36 с, 25.16 с |

В отличие от полных эфиров *H*-фосфонатов и фосфоформиатов AZT и d₄T, производные фосфоацетатов **133-136** 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.

2.2.4. 5'-Аминокарбонилфосфонаты AZT

Проанализировав полученные данные по фосфазиду, эфирам *H*-фосфонатов **91-110**, производным других фосфонатов **112-119**, **121-126** и **133-136**, 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 **127-129**, которые служили ключевыми исходными соединениями для синтеза эфиров **121-123**. Были дополнительно получены 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT с этильной, бутильной и гексильной группами по NH-фрагменту (рис. 20).

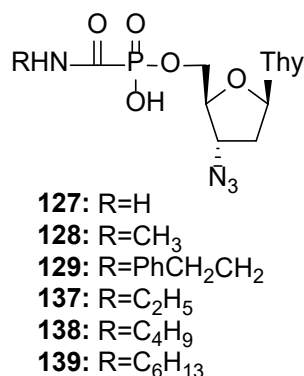


Рисунок 20. Заряженные 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT

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 16). В то же время их токсичность, за исключением производных **128** и **137**, 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 16)[320, 321].

Все синтезированные фосфонаты оказались устойчивыми в биологических жидкостях (сыворотка крови человека, цельная кровь собаки). Предварительная оценка фармакокинетических параметров после перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT **127**, **129**, **138** и **139** 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 **127**, **129**, **137** и **138** составляли 3.7, 2.0, 0.8 и 0.9 мг/л соответственно. Таким образом, в пределах этой группы 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **127** был самым эффективным донором AZT. Это соединение было изучено более подробно[320, 321].

Таблица 16. Анти-ВИЧ свойства фосфонатов **127-129**, **137-139** в культуре клеток, инфицированных ВИЧ-1

| Соединение | МТ-4 (ГКВ-4046) | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| | CC ₅₀ , мкМ | EC ₅₀ , мкМ | SI* |
| 127 | 2700 | 0.60 | 4500 |
| 128 | 210 | 0.20 | 1050 |
| 129 | 1080 | 0.20 | 5400 |
| 137 | 260 | 0.23 | 1130 |
| 138 | 1970 | 0.48 | 4100 |
| 139 | 1500 | 0.11 | 13600 |
| AZT | 80 | 0.037 | 2200 |
| <i>H</i> -фосфонат AZT | 180 | 0.131 | 1400 |

*индекс селективности $SI = CC_{50}/EC_{50}$

2.2.4.1. Оптимизация синтеза 5'-аминокарбонилфосфоната AZT

Описанный выше синтез **127** из эфира **111a** обеспечивает практически количественный выход. Однако получение **111a** конденсацией этоксикарбонилфосфоновой кислоты и AZT в присутствии ДЦК (см. выше) ориентировано на получение небольших количеств вещества и включает использование сложных приемов хроматографического выделения и очистки. В то же время отмеченная эффективность **127** и перспективы проведения дальнейших биологических испытаний требовали разработки упрощенного способа фосфонилирования нуклеозида, реализуемого в типовой промышленной аппаратуре и позволяющего получать 5'-аминокарбонилфосфонат **127** с хорошим выходом и степенью чистоты не менее 96%.

С целью оптимизации способа синтеза были рассмотрены десять теоретически возможных путей получения целевого продукта **127** (схема 18).

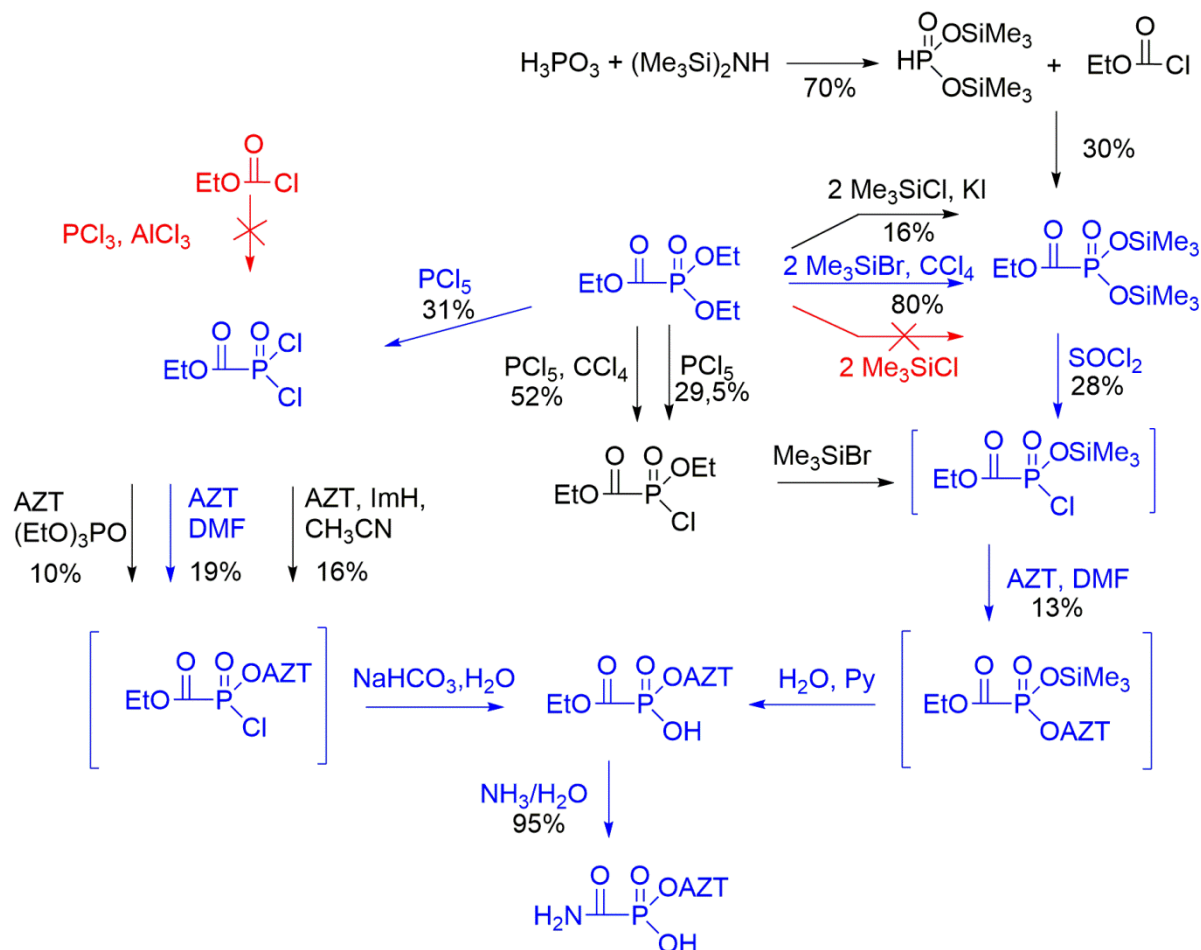


Схема 18. Возможные пути получения целевого 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **127**

Все десять теоретически возможных путей синтеза, представленных на схеме 18, были экспериментально проверены. В двух случаях, а именно: 1) с

триэтилфосфоформиатом и триметилхлорсиланом при нагревании; 2) с безводным хлористым алюминием и трёххлористым фосфором и с хлоругольным эфиром, желаемые интермедиаты получить не удалось. В шести случаях, а именно в реакции: 3) с триэтилфосфоформиатом и триметилхлорсиланом и йодистым калием при нагревании; 4) фосфористой кислоты с гексаметилдисилазаном с последующей обработкой хлоругольным эфиром; 5) триэтилфосфоформиата с пентахлоридом фосфора и последующей обработкой AZT в триэтилфосфате; 6) триэтилфосфоформиата с пентахлоридом фосфора и последующей обработкой AZT и имидазолом в ацетонитриле; 7) триэтилфосфоформиата в четырёххлористом углероде и последующей обработкой одним эквивалентом пентахлорида фосфора и последующей обработкой триметилбромсиланом; 8) триэтилфосфоформиата с пентахлоридом фосфора и последующей обработкой триметилбромсиланом ключевой интермедиат **111a** был получен с низким выходом. И два метода синтеза, а именно: 9) обработка триэтилфосфоформиата триметилбромсиланом, последующие реакции с тионилхлоридом и AZT в ДМФА, гидролиз и финальная обработка водным аммиаком (общий выход на AZT 23,5%), и 10) реакция триэтилфосфоформиата с пентахлоридом фосфора, последующей обработкой AZT в ДМФА и финальным аммонолизом (общий выход на AZT 16,7%), показали относительно высокие результаты. В итоге был выбран метод получения **127** с использованием в качестве фосфонилирующего агента дихлорангидрида этоксикарбонилфосфоновой кислоты. Преимуществами последнего метода, несмотря на чуть более низкий выход, являются менее дорогие реагенты и упрощение технологии процесса, за счет исключения двух промежуточных хроматографических очисток[322].

Таким образом, удалось разработать простой и технологичный способ синтеза вещества лидера, 5'-аминокарбонилфосфоната **127**, позволяющий получать целевой фосфонат в препаративных количествах и чистотой не менее 96%

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

Изучение противовирусной активности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **127** на культуре лимфобластоидных клеток человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1 штамм ГКВ-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 **127** обладал более высоким химиотерапевтическим индексом, чем AZT и фосфазид[320, 321, 323, 324].

Эффективность проникновения в клетки фосфоната **127** была в 10–100 раз ниже, чем AZT, и приблизительно в 6 раз ниже, чем у фосфазид[297, 320, 321]. Это позволяет предположить, что понижение анти-ВИЧ активности и токсичности в культуре клеток МТ-4 по сравнению с показателями для AZT и фосфазид отражает уменьшение эффективности проникновения в клетки, т.е. существует прямая зависимость между проникновением фосфоната **127**, фосфазид и AZT в культивируемые клетки и противовирусными свойствами этих соединений. Необходимо отметить, что обе депонированные формы достаточно стабильны при испытании в культуре клеток, в то время как в организме они эффективно превращаются в AZT[320, 321].

2.2.4.3. Исследование стабильности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT

Стабильность фосфоната **127** в 100% сыворотке крови человека оказалась сопоставимой со стабильностью фосфазид: время полужизни обоих соединений превышает 6 ч[320, 321]. В то же время в цельной крови собаки при 37°C фосфонат **127** был существенно более устойчивым, чем фосфазид ($T_{1/2} > 24$ ч против 3 ч).

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

Беспородные собаки (средний вес 22 ± 3.4 кг)

В результате фармакокинетического изучения препарата **127** (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 **127** приведены в табл. 17.

Сравнение фосфоната **127** с AZT и фосфазидом (табл. 18) показало, что пиковая концентрация AZT при приеме фосфоната **127** в плазме была ниже, тогда как накопление AZT и время выведения были более длительными. Фармакокинетические параметры AZT, образующегося из фосфоната **127**, были близки к параметрам фосфазид (C_{\max} в 2.5 раза

¹ Исследования проведено в сотрудничестве с АО «Ассоциацией AZT»

меньше, AUC в 2 раза меньше, но t_{\max} и другие параметры больше). Максимальная концентрация AZT после перорального приема фосфоната **127** достигалась через 4 ч, что в 2 раза больше, чем при приеме AZT, и на 1 ч больше, чем у фосфазида (табл. 18).

Таблица 17. Фармакокинетические параметры 5'-аминокарбонилфосфоната **127** и его основного метаболита AZT после однократного перорального приема собаками капсул 5'-аминокарбонилфосфоната **127** в дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы тела

| Доза 127 , 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 | 127 | 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 | 127 | 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 | 127 | 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.

Таблица 18. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **127**, 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 |
|------------|----------------------|-------------------|---------------------|------------------|----------------|---------------|
| 127 | 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

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

рассматривать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **127** как депо-форму AZT пролонгированного действия.

В плазме крови собак после внутривенного введения субстанции фосфоната **127** в дозе 50 мг (2–5 мг/кг веса тела) AZT не был зафиксирован. Фармакокинетические параметры исходного **127** составляли: $AUC_t = 2.19 \text{ мг} \cdot \text{ч/л}$, $t_{1/2} = 0.35 \text{ ч}$, $MRT = 0.74 \text{ ч}$, $CL = 16.8 \text{ л/ч}$, $V_{ss} = 12.4 \text{ л}$.

Биодоступность 5'-аминокарбонилфосфоната **127** после перорального приема в использованных дозах составляла 4.7%, а биодоступность AZT после перорального приема **127** – 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 **127**. 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 **127** перепад между максимальной и минимальной концентрацией AZT в крови существенно менее выражен, что может способствовать снижению токсичности и замедлению возникновения резистентности.

Кролики породы шиншилла (средний вес $3 \pm 0.4 \text{ кг}$)

Изучение фармакокинетики фосфоната **127**, 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 **127** вводили внутривенно, – единственным обнаруженным продуктом был исходный фосфонат **127**[3]. Это подтверждает гипотезу о том, что AZT образуется во время абсорбции исходного соединения[3].

Сравнение фармакокинетических параметров AZT и фосфоната **127** после однократного перорального приема кроликами фосфоната **127** 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 **127** практически не менялись при изменении дозы[320, 321].

Результаты сравнения фармакокинетических свойств AZT после перорального приема кроликами однократной дозы AZT, фосфазида или фосфоната **127** приведены в таблице 19. Следует отметить, что форма кривой зависимости концентрации AZT, высвобожденного из фосфоната **127**, была существенно более гладкой, величины C_{\max} AZT, высвобожденного из фосфазида или фосфоната **127**, отличались только в 2 раза, а величины AUC обоих фосфонатов были довольно близкими.

Таблица 19. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема кроликами 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **127**, 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 |
|------------|----------------------|-------------------|---------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 127 | 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

Крысы линии Вистар и мыши линии BALB/c

При пероральном введении крысам (масса тела 200 ± 7 г) фосфоната **127** в дозе 20 мг/кг исходный фосфонат **127** 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[4].

При внутрибрюшинном введении крысам (масса тела 250 ± 10 г) фосфоната **127** в дозе 20 мг/кг, наоборот, в плазме определялся главным образом сам фосфонат **127** и следовые количества его метаболита AZT[4]. Фармакокинетические параметры фосфоната **127** 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 **127** в дозе 6 г/кг веса в крови выявлен не только исходный фосфонат **127**, но и 3.5% AZT.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **127** высвобождает AZT после введения различными способами (перорально, внутривенно или внутрибрюшинно) экспериментальным животным (мыши, крысы, кролики и собаки) в широком диапазоне доз (7–6000 мг/кг веса)[3]. Фармакокинетические параметры фосфоната **127** 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.

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

Результаты многократного приема 5'-аминокарбонилфосфоната AZT также выглядят многообещающими[4].

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 **127** постепенно накапливается в крови (*рисунок*). 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 **127** вводили перорально (600 мг натошак в течение 7 дней с интервалом 24 ч). AZT определялся в плазме на протяжении всего интервала между приемами фосфоната **127**. 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 **127** 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).

2.4.2.6. Исследование распределения 5'-аминокарбонилфосфоната AZT в тканях²

Важный этап фармакокинетических исследований – изучение тканевой доступности новых лекарственных средств. В результате процессов распределения лекарственное средство транспортируется в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. Определение величины тканевой доступности позволяет количественно оценить интенсивность проникновения действующего вещества в периферические ткани и орган-мишень.

² Исследования проведено в АО «Ассоциации AZT»

Распределение AZT, образующегося при распаде фосфоната **127**, изучали в органах и тканях, отличавшихся степенью кровоснабжения, в органах, обеспечивающих выведение, и в органе – зоне потенциального действия[4]. Были исследованы хорошо васкуляризированные (печень, почки, селезенка, легкие), умеренно васкуляризированные (скелетные мышцы) и слабо васкуляризированные ткани (брыжейка). AZT обнаружили во всех этих органах и тканях, причем его распределение по органам характеризовалось значительной гетерогенностью. Предел количественного определения составлял 10 нг/мл. После однократного перорального введения фосфоната **127** в дозе 100 мг/кг тела AZT определялся в плазме крови и органах крыс в течение 12 ч. При этом тканевая доступность AZT в сильно васкуляризированных органах (печень, селезенка, легкие, почки) была значительно выше, чем в скелетной мускулатуре и брыжейке.

Снижение концентрации AZT в основном носило монофазный характер. Полупериод выведения после перорального введения составил 3.9 ч (плазма крови)[4].

После однократного перорального введения фосфоната **127** в дозе 200 мг/кг исходное соединение не определялось в суточной моче и кале, что может быть обусловлено интенсивной биотрансформацией препарата на фазе всасывания. Обнаружен только основной метаболит AZT, который выводится в незначительных количествах (4.11 и 0.04% соответственно) от введенной дозы препарата[4].

2.4.2.7. Исследование токсичности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT³

Результаты исследования токсичности на мышах подтвердили предположение о том, что медленное накопление в крови и более медленное выведение AZT, высвобожденного из фосфоната **127**, по сравнению с AZT, введенным непосредственно и высвобожденным при введении фосфазиды, может привести к уменьшению токсичности[4]. Действительно, фосфонат **127** является малотоксичным препаратом, что подтверждается результатами опытов по определению острой токсичности (мыши линии BALB/c и крысы Вистар) и хронических экспериментов (крысы Вистар, беспородные собаки). Однократное введение препарата мышам и крысам в испытанных токсических дозах (2000–50000 мг/кг) сопровождалось кратковременным возбуждением животных, сменявшимся угнетенным состоянием, вялостью и адинамией. Средняя летальная доза (LD₅₀) фосфоната **127** при внутрибрюшинном введении мышам составила ≥ 5 г/кг по

³ Исследования проведено в АО «Ассоциации AZT».

сравнению с 1.5 и 2.3 г/кг для AZT и фосфазида соответственно. LD₅₀ при однократном введении в желудок крысам превысила 40 г/кг.

Токсичность фосфоната **127** изучали в условиях хронического эксперимента на крысах, которым ежедневно в течение 3 мес. внутрижелудочно вводили этот препарат в дозе 133 и 266 мг/кг. Испытанные дозы препарата превышали высшую суточную терапевтическую дозу для человека в 10 и 20 раз (13.3 мг/кг веса). Оказалось, что соединение **127** в испытанных дозах хорошо переносится животными и не влияет на функциональное состояние основных органов и систем организма (по данным биохимических тестов), а также на гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия подтверждено при патоморфологическом исследовании, проведенном после окончания эксперимента.

Токсичность лекарственной формы фосфоната **127** (капсулы для приема внутрь по 200 мг) оценивали на собаках, которым в течение 4 нед. ежедневно внутрижелудочно вводили препарат в дозе 166 мг/кг (12.5-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека). Установлено, что лекарственная форма хорошо переносится животными и по данным биохимических тестов не влияет на функциональное состояние внутренних органов, а также на их гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия фосфоната **127** в лекарственной форме при длительном введении в желудок собакам подтверждено результатами патоморфологических исследований.

Для оценки мутагенных свойств фосфоната **127** изучили его способность вызывать генные мутации в индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса, вызывать хромосомные aberrации в клетках костного мозга гибридных мышей F1(CBAxС57Bl6) и влиять на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей. Показало, что фосфонат **127** в концентрации до 1 мг на чашку не вызывает статистически значимого увеличения числа ревертантов в тесте Эймса. В дозах, более чем в 50 раз превосходящих высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, фосфонат **127** не показал мутагенности в тестах *in vivo*: он не вызывает увеличения числа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей и не влияет на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей.

При ежедневном внутрижелудочном введении соединения **127** в дозе 133 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека) крысам Вистар

(самцам в течение 10 нед., самкам – в течение 2 нед.) не установлено влияния препарата на репродуктивную функцию животных.

При ежедневном введении в желудок беременным крысам с 1 по 19 день гестации в дозе 133 мг/кг фосфонат **127** не влиял на увеличение массы тела беременных крыс, продолжительность беременности, количество желтых тел, мест имплантации, массу тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер, показатели пред- и постимплантационной гибели плодов, а также постнатальное развитие крысят. Прием соединения **127** не вызывал каких-либо уродств или пороков развития эмбрионов, иными словами, оно не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием.

Аллергизирующие свойства фосфоната **127** были изучены на морских свинках. Установлено, что при 5-кратном внутрижелудочном введении препарата в сенсibilизирующих дозах, 133 и 266 мг/кг, и внутрижелудочном введении разрешающей дозы препарата 266 мг/кг на 14 и 21 день после сенсibilизации фосфонат **127** не вызывает анафилактического шока. Препарат в испытанных дозах и схемах сенсibilизации не проявляет аллергизирующего действия в реакции гиперчувствительности типа III у морских свинок. Кроме того, показано, что фосфонат **127** не влияет на реакцию подколенного лимфоузла у мышей.

В дозах 166 и 332 мг/кг (12.5- и 25-кратные высшие терапевтические дозы, рекомендованные для человека) фосфонат **127** не влияет на число ядродержащих клеток в селезенке, а также на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей. В наибольшей из испытанных доз (332 мг/кг) фосфонат **127** несколько снижает первичный иммунный ответ у мышей F1(CBAxC57Bl6).

Таким образом, доказано, что 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **127** 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.

Линейность фармакокинетики фосфоната **127** по его основному метаболиту AZT позволила рассчитать дозу для человека по результатам, полученным на животных. Так, при однократном пероральном приеме 600 мг фосфоната **127** можно ожидать, что концентрация AZT в плазме крови человека составит 60–70 нг/мл при достаточно пологой фармакокинетической кривой, что существенно превосходит минимальную концентрацию AZT при регулярном (трижды в день по 200 мг) пероральном приеме Зидовудина[325].

Клиническое изучение фосфоната **127** 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 **127** практически полностью метаболизируется до AZT и подтвердили данные доклинических исследований о пролонгированном действии **127**. На рисунке 21 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 **127** (1000 мг однократно).

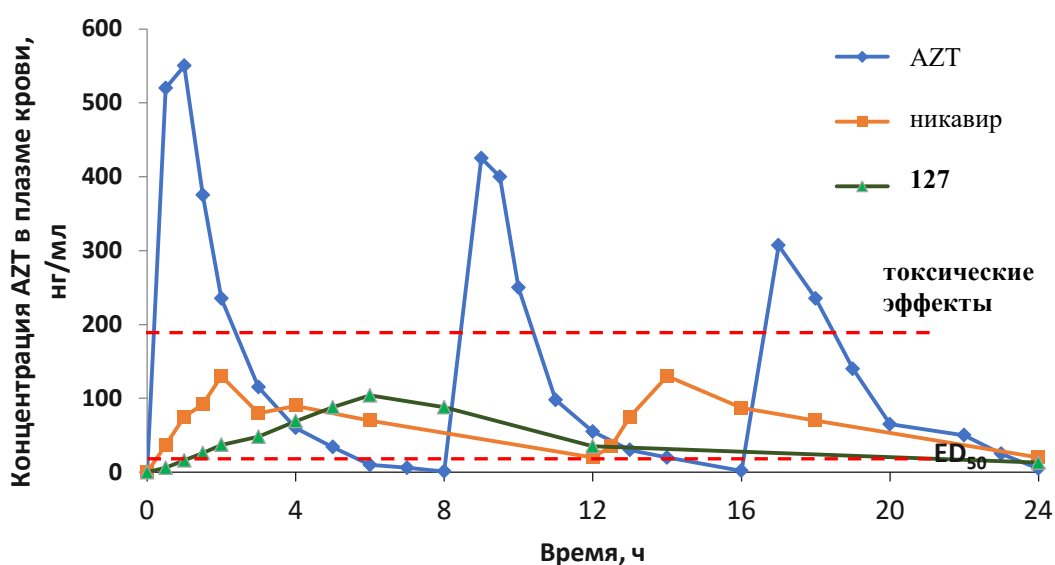


Рисунок 21. Концентрация AZT в плазме крови после перорального приема добровольцами зидовудина (3 раза по 200 мг), фосфазида (два раза 400 мг), фосфоната **127** (1000 мг однократно)

Выводы по разделу 2.2.

В рамках данной работы были синтезированы 53 новые потенциальные депо-формы НИОТ ВИЧ-1, основанные 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'-аминокарбонилфосфоната AZT **127**. Доклинические испытания 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **127** дали обнадеживающие результаты. Фармакокинетические исследования, проведенные на животных, показали, что при приеме внутрь фосфонат **127** 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 **127** 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 **127** 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 **127** имеет превосходный потенциал как альтернатива AZT и Никавиру, заслуживает дальнейшего исследования и в настоящий момент проходит 3 стадию клинических испытаний.

2.3. 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.

2.3.1. *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[326] (рис. 22) является депо-формой двух анти-ВИЧ препаратов: AZT (зидовудин или ретровир) и 3ТС (ламивудин), применяемых в высоко активной антиретровирусной терапии совместно, в виде коктейля «Комбивир».

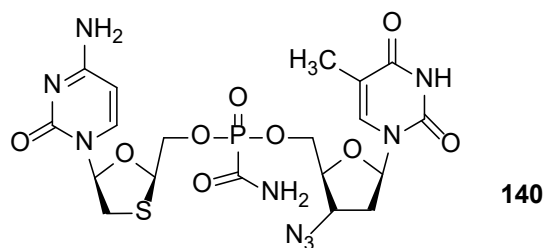


Рисунок 22. Структура гетеродимера **140**, содержащего два нуклеозидных ингибитора ОТ ВИЧ

2.3.1.1. Синтез O-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-O'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната.

Гетеродимер **140** получали двумя сходными способами. На начальном этапе в обоих случаях проводили синтез этоксикарбонилфосфоновой кислоты. При этом к этилдиэтоксифосфоформиату при комнатной температуре добавляли триметилбромсилан. Далее в первом случае, взаимодействием этоксикарбонилфосфоновой кислоты с AZT в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и пиридина при комнатной температуре получали этоксикарбонилфосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина. Во втором случае, сходным образом, взаимодействием этоксикарбонилфосфоновой кислоты с ЗТС в присутствии ДЦК и пиридина получали этоксикарбонилфосфонат 2',3'-дидеокси-3'-тиацитидина. Следующим этапом синтеза в обоих случаях было получение 5'-аминокарбонилфосфонатов. Их получали обработкой соответствующих этоксикарбонилфосфонатов 25% водным раствором аммиака при комнатной температуре в течение 18 часов.

Получение целевого гетеродимера **140** проводили соответственно взаимодействием 5'-аминокарбонилфосфоната AZT с ЗТС или же 5'-аминокарбонилфосфоната ЗТС с AZT. Реакцию проводили в присутствии конденсирующего агента TPSCl, в пиридине в течение 72 часов. Целевой O-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-O'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат был охарактеризован методами ^1H , ^{31}P -ЯМР спектроскопии.

Два пути синтеза сравнили с точки зрения выхода целевого продукта и условий разделения реакционной смеси. Качественная оценка проводилась с использованием ТСХ на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄. В качестве элюента были опробованы несколько вариантов хроматографических систем (см. таблицу 20). Наилучшее разделение было достигнуто в системе этилацетат: хлороформ: метанол: вода / 3:4.5:1.5:0.25, содержащей

0.2% уксусной кислоты, именно эту систему использовали в дальнейшем, как для тонкослойной, так и для колоночной хроматографии.

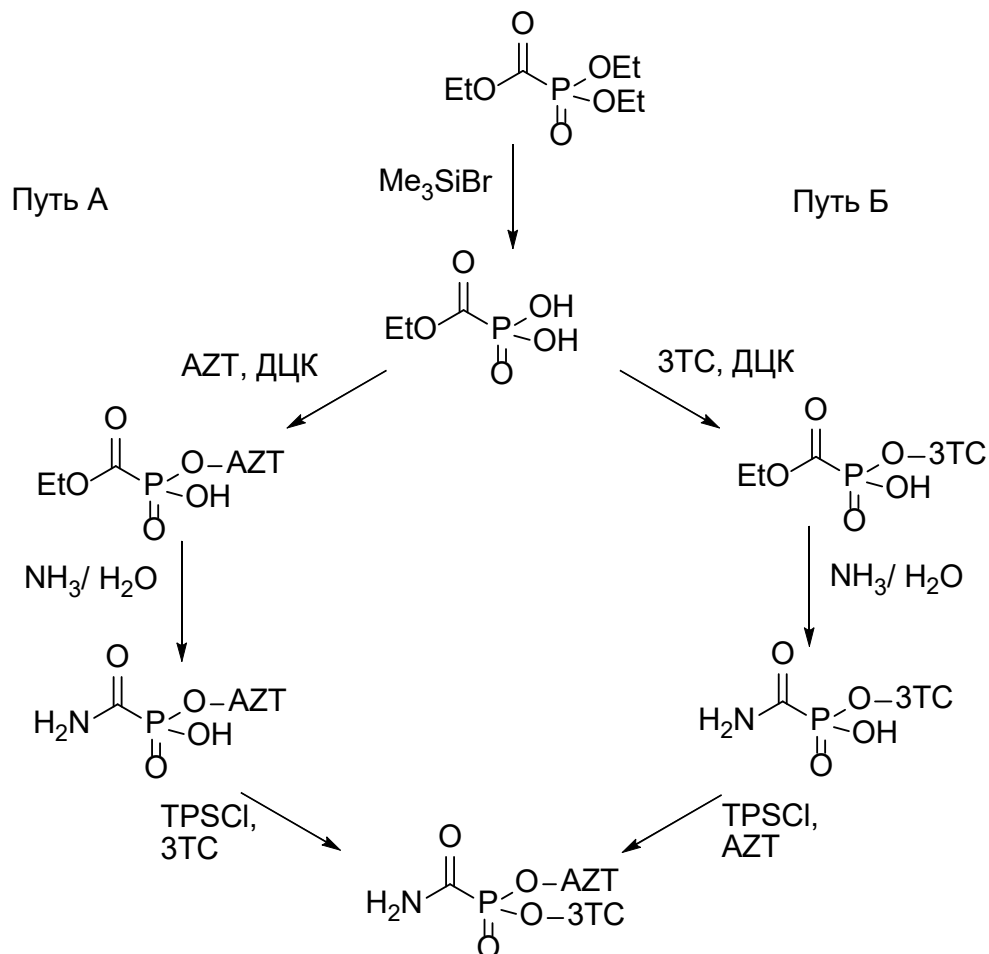


Схема 19. Пути синтеза гетеродимера **140**

Проведенное сравнение показало, что путь А и путь Б приводят к целевому гетеродимеру **140** с выходом 45-55%, т.е. существенных различий обнаружено не было. Однако в случае взаимодействия 5'-аминокарбонилфосфоната AZT с 3TC выделение и очистка целевого димера были затруднены большим остаточным количеством исходного 3TC, взятого в реакцию в избытке и имеющего R_f близкий с целевым продуктом. В то же время AZT, оставшийся после конденсации 5'-аминокарбонилфосфоната 3TC с AZT в силу большей разницы в R_f не осложнял выделения и очистки целевого продукта.

Таким образом, для наработки целевого продукта **140** более подходящим оказался путь Б. По данной схеме было наработано 2 г целевого *O*-(L-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил) аминокарбонилфосфоната **140**.

Общий выход на этоксикарбонилфосфовую кислоту составил 32%, выход на последней стадии - 55%.[326]

Таблица 20. Сравнение условий хроматографии для разделения реакционных смесей синтеза гетеродимера **140**.

| Система | R_f | | | |
|--|-------|------|------------|-----------------------------------|
| | AZT | ЗТС | 140 | Фосфонаты 127 и 141 |
| хлороформ: метанол / 9:1 | 0.85 | 0.32 | 0.3 | <0.1 |
| этилацетат: хлороформ: метанол / 2:3:1 | 0.6 | 0.25 | 0.2 | 0.1 |
| этилацетат: хлороформ: метанол: вода / 3:4.5:2.5:0.25 | 0.95 | 0.5 | 0.45 | 0.1 |
| этилацетат: хлороформ: метанол: вода / 3:4.5:1.5:0.25 +0.2% уксусной кислоты | 0.9 | 0.35 | 0.2 | 0.05 |

2.3.1.2. Стабильность *O*-(*L*-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната.

Гидролиз гетеродимера приводит к смеси четырех продуктов: 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **127**, ЗТС, AZT, 5'-аминокарбонилфосфонат ЗТС **141** (рис. 23).

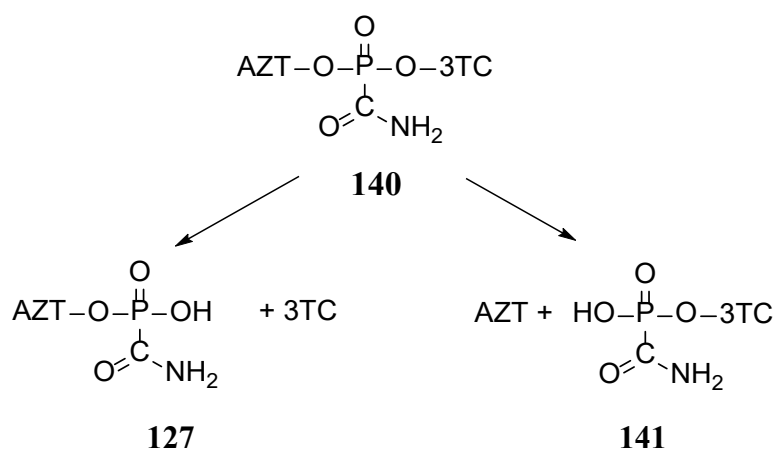


Рисунок 23. Структуры продуктов гидролиза гетеродимера **140**.

В предыдущих разделах работы было показано, что 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT (**127**) и 3ТС (**141**) являются эффективными депо-формами пролонгированного действия соответствующих НИОТ[3, 320, 327-329]. Таким образом, независимо от пути гидролиза, целевой *O*-(*L*-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат **140** будет давать оба необходимых антивирусных агента.

Данный гетеродимер мало стабилен при щелочных и нейтральных значениях pH, однако при переходе в слабо-кислую и кислую среды стабильность значительно возрастает (см. таблицу 21).

Таблица 21. Химическая стабильность целевого гетеродимера **140**.

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

2.3.1.3. Исследования *O*-(*L*-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфоната на культурах клеток и тканей.

Изучение токсичности и антивирусной активности целевого гетеродимера **140** 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 [326].

Анти-ВИЧ активность гетеродимера **140** дополнительно исследовали в лимфоидной ткани человека *ex vivo*, в 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)[326]. 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 **140** 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[326].

Таблица 22. Токсичность и анти-ВИЧ активность целевого гетеродимера **140**

| Соединение | ED ₅₀ , мкМ | TD ₅₀ , мкМ | SI |
|------------------------|------------------------|------------------------|---------|
| Гетеродимер 140 | 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 **140**, и в необработанном контроле от того же донора[326]. 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 **140** в тканях показало, что он расщепляется на AZT, аминокарбонилфосфонат AZT **127**, 3ТС и аминокарбонил фосфонат 3ТС **141**. Первая стадия гидролиза является быстрой, спонтанной и не опосредуется какими-либо ферментами. После 18-часовой инкубации по данным ВЭЖХ анализа производные фосфонатов **127** и **141** находятся в значительном избытке в плазме крови по

сравнению с ЗТС и AZT[326]. В дальнейшем фосфонатные производные **127** и **141** медленно превращаются в AZT и ЗТС.

Таким образом, преимущество использования гетеродимера ЗТС-AZT **140** 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 **127** и **141**, затем расщепляются до ЗТС и AZT медленно, сглаживая фармакокинетический профиль, продлевая присутствие НИОТ и создавая таким образом эффект депо[326].

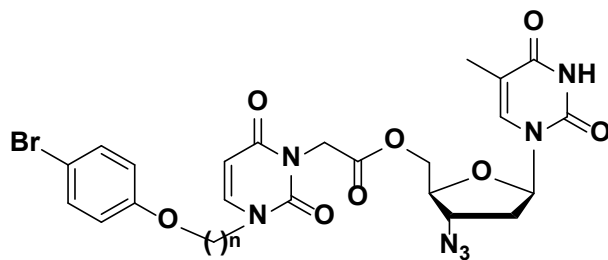
2.3.2. Комбинированные противовирусные агенты против ВИЧ и HCMV

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 (ВААРТ), 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.

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

Соединения **142a-f** (рис. 24) представляют собой конъюгаты 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина, классического нуклеозидного ингибитора биосинтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ, и ненуклеозидных ингибиторов репликации HCMV[214]. В качестве ненуклеозидных ингибиторов репликации HCMV

были выбраны 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производные урацила, ранее продемонстрировавшие существенную активность[167].



142a: n=3; **142b:** n=5; **142c:** n=6; **142d:** n=8; **142e:** n=10; **142f:** n=12

Рисунок 24. Структуры гетеродимеров **142**

Для получения целевых гетеродимеров **142a-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 **142a-f** после выделения и очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле составили 52-74%[214].

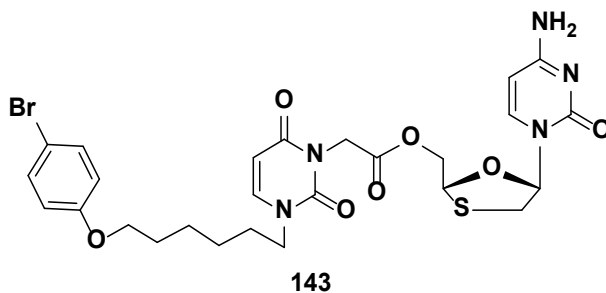


Рисунок 25. Структура гетеродимера **143**

Сходным образом был получен гетеродимер **143** (рис. 25), содержащий в качестве НИОТ ВИЧ ЗТС и 1-[6-(4-бромфенокси)гексил]урацил, соединенные остатком уксусной кислоты. К раствору ЗТС и [3-[6-(4-бромфенокси)гексил]-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]уксусной кислоты в пиридине добавили 1.2 эквивалента 1,3-дициклогексилкарбодиимида и оставили перемешиваться 16 часов при комнатной температуре. Продукт выделяли препаративной хроматографией на пластинах со слоем силикагеля 2 мм в системе хлороформ-метанол 9:1. Выход составил 19,5%.

Структуры и высокую степень чистоты соединений **142a-f** и **143** подтверждали современными физико-химическими методами (^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, тонкослойная хроматография в различных системах).

2.3.2.2. Исследование стабильности гетеродимеров, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ НСМВ

Соединения **142a-f** продемонстрировали высокую химическую стабильность и способность высвобождать активные противовирусные компоненты под действием эстераз (рис. 26).

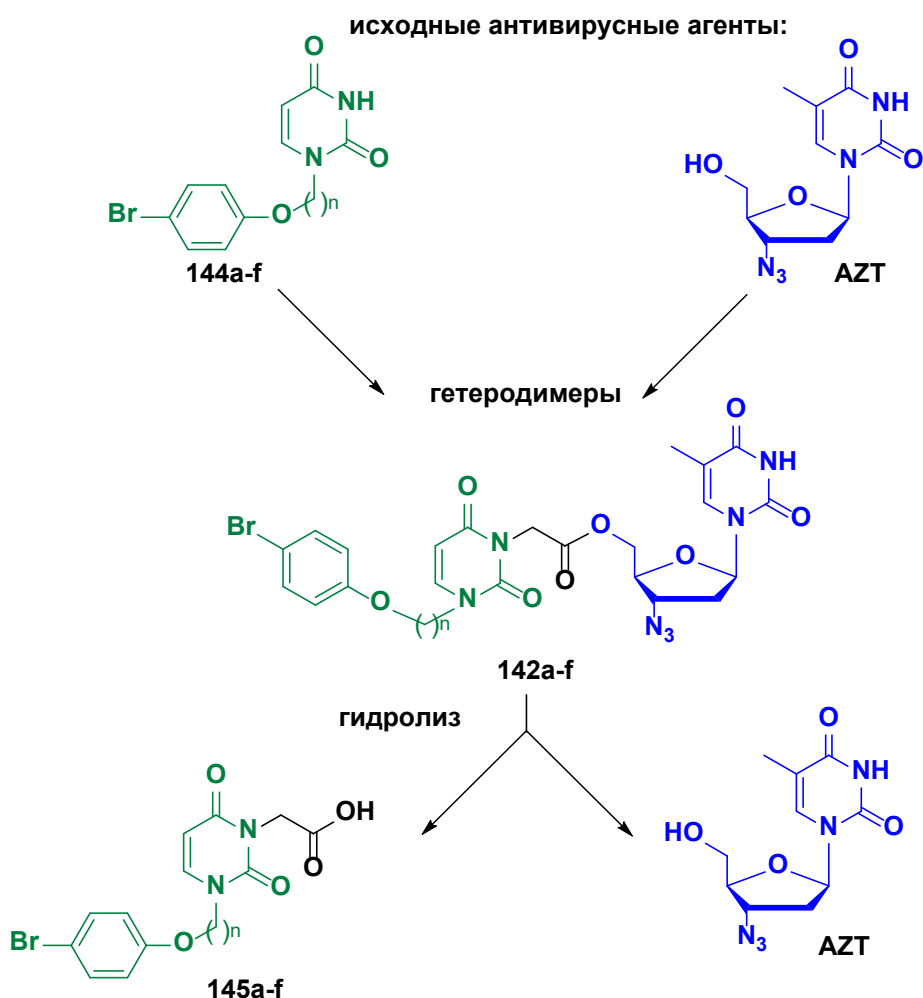


Рисунок 26. Продукты гидролиза гетеродимеров **142a-f** под действием эстераз

В процессе гидролиза в присутствии эстеразы из печени свиньи (буфер трис-HCl 50 mM pH 8.2, NaCl 250 mM, CaCl_2 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 **143** протекал более медленно, но с образованием аналогичных продуктов: ЗТС и соответствующая [2,6-диоксо-3-[6-(4-бромфенокси)гексил]-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]уксусной кислоты.

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

Предварительную оценку активности конъюгатов **142a-f** против HCMV проводили в лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека.

Таблица 23. Токсичность и анти-HCMV активность гетеродимеров **142** на культуре клеток диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека, инфицированных HCMV (шамм) AD169

| Соединение | Токсичность ^a CC ₅₀ (μM) | Антивирусная активность ^b EC ₅₀ ± SD (μM) |
|-------------|---|--|
| 142a | 347 | 3.2 ± 0.8 |
| 142b | 173 | 4.4 ± 2.1 |
| 142c | 393 | 7.9 ± 3.0 |
| 142d | 600 | 12.2 ± 1.7 |
| 142e | 182 | 3.2 ± 0.5 |
| 142f | 253 | 5.1 ± 1.2 |
| ганцикловир | 500 | 2.0 ± 0.5 |

^aCC₅₀: концентрация вещества, в присутствии которой жизнеспособность клеток уменьшается на 50%. ^bEC₅₀: Эффективная концентрация вещества, ингибирующая репликацию HCMV на 50%.

Показано, что конъюгаты **142a-f** обладают противовирусной активностью в отношении HCMV. В таблице 23 приведены данные EC_{50} , полученные в терапевтической схеме воздействия соединений, результаты в микробицидной схеме воздействия соединений были близки по значениям и составили 2-9 μM . В качестве контрольного препарата был использован ганцикловир. Конъюгаты **142a-f** не продемонстрировали существенной цитотоксичности для диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека. Для разных соединений CC_{50} была в пределах от 170 до 600 μM , что так же сопоставимо с ганцикловиром ($CC_{50} = 500 \mu\text{M}$).

Цитотоксичность и анти-ВИЧ активность соединений были проверены на культуре клеток MT-4. Полученные результаты представлены в таблице 24.

Результаты исследования токсичности и анти-ВИЧ активности соединений на культуре клеток MT-4 в сочетании с данными по активности против HCMV и цитотоксичности для диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека позволили выбрать соединение **142c**, для дальнейшего изучения в системе тканей человека *ex vivo*.

Таблица 24. Токсичность и анти-ВИЧ активность гетеродимеров **142** на культуре клеток MT-4

| Соединение | Токсичность | анти-ВИЧ активность |
|-------------|---------------------------|---------------------------|
| | CC_{50} , μM | ID_{50} , μM |
| 142a | 82.1 | 1.96 ± 0.78 |
| 142b | >100 | 0.61 ± 0.31 |
| 142c | >100 | 0.53 ± 0.29 |
| 142d | >100 | 0.23 ± 0.11 |
| 142e | >100 | 0.44 ± 0.29 |
| 142f | >100 | 0.21 ± 0.1 |
| AZT | >100 | 0.003 |

CC_{50} : концентрация вещества, в присутствии которой жизнеспособность клеток MT-4 уменьшается на 50%. ID_{50} : эффективная концентрация вещества, ингибирующая репликацию ВИЧ-1 на 50%.

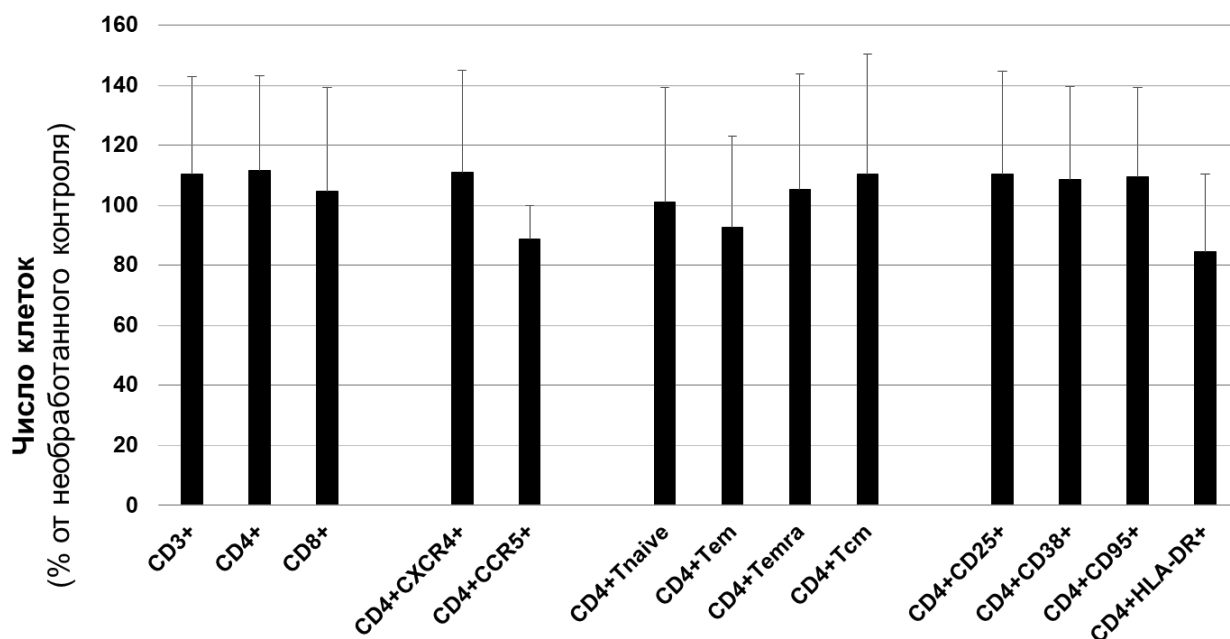


Рисунок 27. Оценка токсичности соединения **142c** (10 мкМ) в тканях миндалин (n=7).

Оценку цитотоксичности гетеродимера **142c** в системе тканей человека *ex vivo* на фрагментах ткани миндалин, культивированных в соответствии с разработанной ранее методикой[326, 330], 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 цитотоксичности соединения **142c** в системе тканей человека *ex vivo* фрагменты ткани миндалин были обработаны синтезированными соединениями в различных концентрациях. Количество клеток, изолированных из экспериментальных и контрольных тканей, сравнили, их жизнеспособность оценивали методом проточной цитометрии. Показано, что конъюгат **142c** в концентрации 10 μ М не проявляет цитотоксичности и не вызывает изменений в различных типах клеток ткани (рис. 27).

Антивирусная активность соединения **142c** также была протестирована в лимфоидных тканях миндалин человека *ex vivo*. Ткани миндалин человека (27 блоков ткани от каждого из 7 доноров для каждого экспериментального состояния) были инфицированы ВИЧ-1 (LAI.04), а затем обработаны соединением **142c** в четырех концентрациях (0,01; 0,1; 1; и 10 мкМ). ВИЧ-1-активность соединений оценивали путем сравнения вирусной репликации в тканях, обработанных лекарственным средством, с репликацией в необработанных контрольных тканях, того же донора. Инфицирование ткани ВИЧ в присутствии и в отсутствие тестируемых соединений оценивали на основании измерений высвобождения вируса в культуральной среде (измерение уровня белка p24) и путем подсчета инфицированных клеток с помощью проточной цитометрии

(измерение внутриклеточного окрашивания p24). Ингибирование ВИЧ-1 при различных концентрациях соединений определяли по следующей формуле: $\text{ингибирование} = 1 - (R_{\text{соединение}} / R_{\text{контроль}}) \times 100$, где $R_{\text{соединение}}$ и $R_{\text{контроль}}$ - количества p24, накопленные в среде за 12-дневный период культивирования в культурах, обработанных соединением, и в необработанных культурах того же донора. Показано дозозависимое ингибирование с полным подавлением репликации ВИЧ при 10 мкМ и EC_{50} между 0,1 и 1 мкМ.

Для оценки эффективности подавления обеих инфекций образцы ткани миндалин были одновременно заражены ВИЧ-1 и HCMV. Полученные образцы (4 шт.) обработали соединением **142с** в концентрации 10 мкМ. Показано полное ингибирование репликации ВИЧ и HCMV (рис. 28).

Блоки человеческой ткани были инфицированы ВИЧ-1 (X4LAI.04) и HCMV (AD169) и культивировались в течение 15 дней при 37°C. Ткани обрабатывали соединением **142с** в концентрации 10 мкМ или оставляли без обработки (контроль). Репликацию ВИЧ-1 оценивали путем измерения p24_{gag} в культуральной среде. Репликацию HCMV измеряли с помощью ПЦР в реальном времени для вирусной ДНК, накопленной в культуральной среде. Для каждого дня представлены средние значения \pm SEM репликации вируса в процентах от кумулятивного вируса, продуцируемого в необработанных контрольных условиях в 6 тканях миндалин от 6 разных доноров.

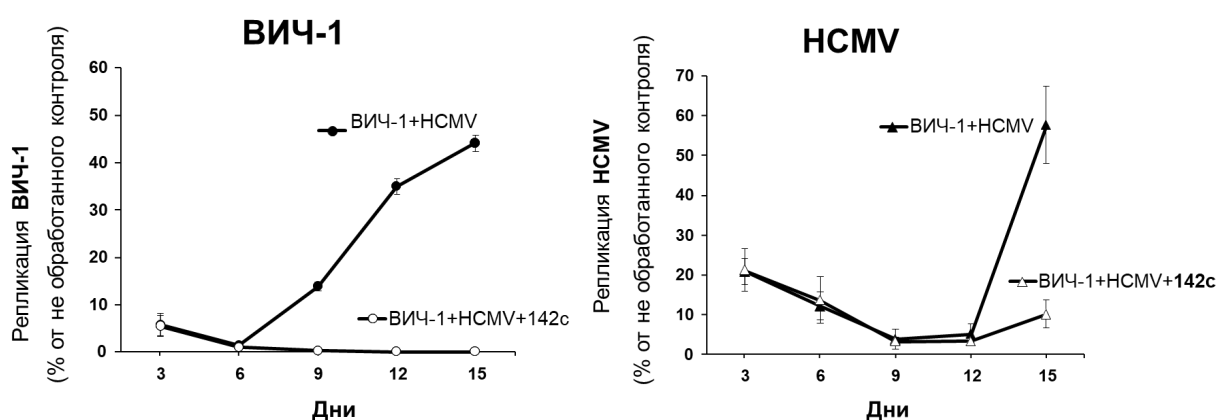


Рисунок 28. Ингибирование репликации ВИЧ-1 и HCMV гетеродимером **142с** в тканях миндалин при двойном инфицировании.

Таким образом, для целевых конъюгатов, содержащих НИОТ ВИЧ-1 и ННИ вирусов семейства герпеса, а именно 5'-[2,6-диоксо-3-(ω-феноксиалкил)-3,6-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил]ацетатов 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина **142** показаны:

- способность высвобождать активные противовирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз);
- противовирусная активность в отношении HCMV. EC₅₀ составило 2-9 μ M в микробицидной и 3-12 μ M в терапевтической схемах воздействия соединений;
- отсутствие существенной цитотоксичности для диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека (CC₅₀ 170- 600 μ M);
- анти-ВИЧ активность на культуре клеток MT-4, инфицированных ВИЧ-1 (EC₅₀ 0.19-0.83 μ M);
- отсутствие существенной цитотоксичности для клеток MT-4 (CC₅₀ >100 μ M);
- отсутствие цитотоксичности в системе тканей человека *ex vivo* для соединений-лидеров в концентрации 10 μ M;
- способность соединений-лидеров в концентрации 10 μ M полностью подавлять репликацию ВИЧ в системе тканей человека *ex vivo*;
- способность соединений-лидеров в концентрации 10 μ M полностью подавлять репликацию ВИЧ и HCMV в системе тканей человека *ex vivo* при одновременном инфицировании ВИЧ-1 (LAI.04) и HCMV[214].

Заключение по разделу 2.3.

Суммарно в ходе выполнения этой части работы осуществлен дизайн и синтез 8 новых гетеродимеров, обладающих активностью в отношении ВИЧ и сопутствующих герпесвирусов. Первый гетеродимер содержит два нуклеозидных ингибитора биосинтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ, AZT и ЗТС. Второй тип гетеродимеров включает 6 конъюгатов AZT, и 1-[ω -(фенокси)алкил]-производных урацила, ненуклеозидных ингибиторов репликации HCMV и один гетеродимер, включающий ЗТС и 1-[6-(фенокси)гексил]-урацил.

Для всех синтезированных соединений изучены физико-химические и спектральные свойства (¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения); подтверждена способность высвобождать активные противовирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз); показано отсутствие цитотоксичности и наличие противовирусной активности.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Общие методы к разделу 2.1.

6-Оксибицикло[3.1.0.]гекс-2-ен. В трехгорлую колбу для перегонки помещали 50 мл дициклопентадиена и нагревали на масляной бане до 160-164°C. При температуре паров 38-42°C начиналась отгонка циклопентадиена, его конденсировали при температуре замерзания метилцеллозольва (-78°C). Деполимеризацию проводили в течение 4-5 часов. К полученному циклопентадиену (25 г, 0.4 моль) в хлористом метиле (100 мл) добавляли прокаленный Na_2CO_3 (20 г, 0.2 моль). Надуксусную кислоту (30 %, 20 мл) прикапывали в течение часа, затем интенсивно перемешивали еще 2 часов. Избыток кислоты нейтрализовали Na_2SO_3 (10 г, 0.06 моль), затем перемешивали реакционную смесь еще 18 часов, соли отфильтровывали, раствор упаривали до половины объема и перегоняли под вакуумом. 6-Оксибицикло[3.1.0.]гекс-2-ен получали с выходом 37% (12 г).

Общая методика получения 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов. К суспензии гетероциклического основания (5-20 ммоль) в 15-30 мл сухого ДМФА при перемешивании в токе аргона добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (5-10%) и раствор 6-оксибицикло[3.1.0.]гекс-2-ена (7-25 ммоль) в 10-20 мл свежеперегнанного ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 18-48 часов при комнатной температуре в темноте. Ход реакции контролировали по ТСХ. Растворители удаляли сначала в вакууме водоструйного, а затем масляного насосов. Целевые продукты выделяли колоночной хроматографией на силикагеле.

3.1.1. Методики к разделу 2.1.1.

3.1.1.1. Синтез карбоциклических аналогов динуклеозидтетрафосфонатов, динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозиддифосфонатфосфатов

В работе были использованы пиридин, ДМФА, ацетонитрил, ДЦК, 6-хлорпурин, 2-амино-6-хлорпурин, тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) (Aldrich, США), триметилбромсилан, триэтиламин, трибутиламин, пивалоилхлорид, N,N-диметилацеталь диметилформамида, КДИ, дициклопентадиен, (Fluka, Швейцария). Этиловый эфир *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты получен по методу⁹³; дибромметилендифосфоновая кислота получена по методу⁹⁴. Диформетилендифосфоновая кислота любезно предоставлена проф. Робертсом (Англия). Растворители перегоняли перед использованием и хранили над молекулярными ситами.

УФ спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония). ^1H ЯМР спектры сняты на спектрометре Bruker AMX III-400 (400 МГц) с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. ^{31}P ЯМР спектры сняты на том же приборе с рабочей частотой 162 МГц при подавлении фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия с использованием 85% H_3PO_4 в качестве внешнего стандарта. ^{19}F спектры сняты на спектрометре Varian "UNITY-NOVA" (367 МГц) в D_2O . Масс спектры регистрировали на масс-спектрометре COMPACT MALDI-4 (Kratos Analytical, США). Колоночную хроматографию проводили на Kieselgel 60 (40-60 μ , Германия); ионнообменную колоночную хроматографию - на DEAE Toyoparl (HCO_3^-) (Toyosoda, Япония), обращеннофазовую колоночную хроматографию - на LiChroprep RP-18 (25-40 μ). Для ТСХ использовали пластинки Кизельгель 60 F254 (Merck, Германия) и элюирующие системы хлороформ-метанол 9 : 1 (система А), диоксан-25% водный NH_3 4 : 1 (система В), *i*-PrOH-вода-25% водный NH_3 7 : 2 : 1 (система С), диоксан-вода-25% водный NH_3 6 : 4 : 1 (система D). ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson (Франция) с интегратором LKB 2220.

(±)-2-Амино-6-хлоро-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурин (2). К суспензии 2-амино-6-хлорпурина (1.75 г, 10 ммоль) в 10 мл сухого ДМФА при перемешивании на ледяной бане в токе аргона добавили суспензию тетракис(трифенилфосфин)палладия (0.23 г, 0.2 ммоль) в 15 мл ДМФА и раствор 6-оксибицикло[3.1.0]гекс-2-ена **1** (1.5 г, 18.3 ммоль) в 20 мл свежеперегнанного ТГФ и реакционную смесь перемешивали 48 часов в темноте при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюировали смесью хлороформ-метанол 9:1. Целевые фракции концентрировали в вакууме и получили 2.1 г (83%) продукта **2** в виде желтоватых кристаллов. УФ (MeOH): λ_{max} 251.3 нм. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м. д.): 1.69 (1H, дт, $J = 14.0$ и 4.4 Гц, 5' β -H), 2.86 (1H, ддд, $J = 14.0$, 8.3 и 7.3 Гц, 5' α -H), 4.74 (1H, м, 4'-H), 5.24 (1H, д, $J = 6.2$ Гц, OH), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.00 (1H, ддд, $J = 5.5$, 2.2 и 1.1 Гц, 2'-H), 6.19 (1H, дт, $J = 5.5$ и 2.0 Гц, 3'-H), 6.74 (2H, с, NH_2), 8.03 (1H, с, 8-H).

(±)-2-Амино-6-метокси-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурин (3). К раствору соединения **2** (100 мг, 0.4 ммоль) в 3 мл метанола добавили безводный K_2CO_3 (100 мг, 0.7 ммоль) и полученную суспензию кипятили 1 час. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюировали смесью хлороформ-метанол 9:1, и целевые фракции концентрировали в вакууме. Выделили 81 мг (81%) продукта **3** в виде белой пены. УФ

(MeOH): λ_{\max} 250.0 и 280.1 нм. ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м. д.): 1.64 (1H, дт, $J = 14.0$ и 4.4 Гц, $5'\beta\text{-H}$), 2.86 (1H, ддд, $J = 14.0$, 8.1 и 7.1 Гц, $5'\alpha\text{-H}$), 3.96 (3H, с, OMe), 4.72 (1H, м, $4'\text{-H}$), 5.28 (1H, д, $J = 6.3$ Гц, OH), 5.29 (1H, м, $1'\text{-H}$), 5.97 (1H, ддд, $J = 5.5$, 2.0 и 1.1 Гц, $2'\text{-H}$), 6.17 (1H, дт, $J = 5.5$ и 1.8 Гц, $3'\text{-H}$), 6.39 (2H, с, NH_2), 7.78 (1H, с, 8-H).

(\pm)-2-Амино-9-[*цис*-4'-(этилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]-6-метоксипурин (4). К раствору соединения **3** (150 мг, 0.6 ммоль) в 2 мл сухого ДМФА при перемешивании в токе аргона добавили NaN (42 мг, 1.4 ммоль) и Cs_2CO_3 (227 мг, 0.7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1.5 часа при комнатной температуре, добавили раствор этилового эфира *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты (235 мг, 0.8 ммоль) в 2 мл ДМФА и раствор перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система В). Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.2 М), целевой продукт **4** элюировали 0.1 М NH_4HCO_3 . Получили 155 мг (70%) продукта **4** в виде бесцветного масла. УФ (H_2O , pH 7, λ_{\max} , нм): 249.9 и 280.2. ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1.11 (3H, м, CH_2CH_3), 1.83 (1H, дт, $J = 14.3$ и 4.0 Гц, $5'\beta\text{-H}$), 2.90 (1H, дт, $J = 14.3$ и 7.2 Гц, $5'\alpha\text{-H}$), 3.60 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH_2P), 3.98 (3H, с, OMe), 4.17 (2H, м, CH_2CH_3), 4.98 (1H, м, $4'\text{-H}$), 5.30 (1H, м, $1'\text{-H}$), 6.17 (1H, м, $2'\text{-H}$), 6.39 (1H, м, $3'\text{-H}$), 7.78 (1H, с, 8-H); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 17.86 с.

(\pm)-9-[*цис*-4'-(Фосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]гуанин (5). К суспензии фосфоната **4** (155 мг, 0.42 ммоль) в сухой ДМФА при перемешивании в токе аргона добавили триметилбромсилан (435 мкл, 367 мг, 3.36 ммоль), и полученный раствор перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система В). Реакционную смесь нейтрализовали 25% водным аммиаком, растворитель удалили в вакууме, остаток очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Выделили 114 мг (83%) продукта **5** в виде белых кристаллов. УФ (H_2O , pH 8) λ_{\max} 252.0 нм (ϵ 10300). ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, $J = 14.3$ и 4.0 Гц, $5'\beta\text{-H}$), 2.99 (1H, дт, $J = 14.3$ и 7.2 Гц, $5'\alpha\text{-H}$), 3.69 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH_2P), 5.08 (1H, м, $4'\text{-H}$), 5.32 (1H, м, $1'\text{-H}$), 6.15 (1H, м, $2'\text{-H}$), 6.40 (1H, м, $3'\text{-H}$), 7.83 (1H, с, 8-H); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 16.05 с.

(\pm)-6-Хлор-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурин (6). Соединение **6** синтезировали и выделяли по методике, описанной для **4**, используя 6-хлорпурин в качестве гетероциклического основания. Продукт **6** получили с выходом 59% в виде желтоватых кристаллов. УФ (MeOH): λ_{\max} 261.5 нм. ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м. д.): 1.69 (1H, дт, $J = 14.8$ и 4.0 Гц, $5'\beta\text{-H}$), 2.86 (1H, м, $J = 14.8$ Гц, $5'\alpha\text{-H}$), 4.64 (1H, м, $4'\text{-H}$), 5.39 (1H, м,

1'-H), 5.52 (1H, д, $J = 7.0$ Гц, OH), 5.92 (1H, д, $J = 4.0$ Гц, 2'-H), 6.14 (1H, м, 3'-H), 8.03 (1H, с, 8-H), 8.09 (1H, с, 2-H).

(±)-9-(*цис*-4'-Гидроксициклопент-2'-енил)-аденин (7) и (±)-6-метокси-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)-пурин. Раствор соединения **6** (200 мг, 0.84 ммоль) в метаноле, насыщенном аммиаком, (30 мл) нагревали при температуре 120°C в течение 4 часов. Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюировали смесью хлороформ-метанол 9:1. Выделили 157 мг (86%) целевого продукта **7** в виде желтоватого масла и 16 мг (9%) (±)-6-метокси-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)-пурина в виде светло-желтого масла.

Соединение **7**. УФ (MeOH): λ_{\max} , 261.4 нм (ϵ 15000). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): 1.69 (1H, дт, $J = 14.8$ и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.84 (1H, м, $J = 14.8$ Гц, 5' α -H), 4.66 (1H, м, 4'-H), 5.39 (1H, м, 1'-H), 5.52 (1H, д, $J = 7.0$ Гц, OH), 5.92 (1H, м, 2'-H), 6.14 (1H, м, 3'-H), 7.24 (2H, с, NH₂), 8.02 (1H, с, 8-H), 8.09 (1H, с, 2-H).

(±)-6-Метокси-9-(*цис*-4'-гидроксициклопент-2'-енил)пурин. УФ (MeOH, λ_{\max} , нм): 254.0, 270.0 (плечо). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): 1.69 (1H, м, 5' β -H), 2.84 (1H, м, $J = 14.8$ Гц, 5' α -H), 3.97 (3H, с, OMe), 4.76 (1H, м, 4'-H), 5.39 (1H, м, 1'-H), 5.52 (1H, д, $J = 7.0$ Гц, OH), 5.94 (1H, м, 2'-H), 6.16 (1H, м, 3'-H), 8.02 (1H, с, 8-H), 8.09 (1H, с, 2-H).

(±)-9-[*цис*-4'-(Этилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин (9). К раствору соединения **7** (130 мг, 0.6 ммоль) в 2 мл сухого ДМФА, охлажденному до +4°C, добавили диметилацеталь диметилформамида (400 мкл, 356 мг, 3 ммоль) и перемешивали 12 часов при температуре +4°C. Растворитель удалили в вакууме, остаток, содержащий диметиламинометиленовое производное **8**, растворили в ДМФА (3 мл) и при перемешивании в токе аргона добавили NaN (42 мг, 1.4 ммоль) и Cs₂CO₃ (227 мг, 0.7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1.5 часа при комнатной температуре, а затем добавили раствор этилового эфира *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты (235 мг, 0.8 ммоль) в 2 мл сухого ДМФА и перемешивали еще 12 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH₄HCO₃ (0-0.2 М). Целевой продукт **4** элюировали 0.1 М NH₄HCO₃ и получили 112 мг (55%) в виде желтоватого масла. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} : 262.5 нм (ϵ 15000). ^1H -ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.11 (3H, м, CH₂CH₃), 1.95 (1H, м, $J = 15.0$, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, м, 5' α -H), 3.70 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH₂P), 4.17 (2H, м, CH₂CH₃), 4.98 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.21 (1H, м, 2'-H), 6.46 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ^{31}P -ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 18.3 с.

(±)-9-[цис-4'-(Фосфометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин (10). К суспензии фосфоната **9** (112 мг, 0.33 ммоль) в сухом ДМФА при перемешивании в токе аргона добавили триметилбромсилан (435 мкл, 367 мг, 2.64 ммоль), полученный раствор перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Избыток триметилбромсилана нейтрализовали 25% водным аммиаком, растворитель удалили в вакууме, остаток делили методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Продукт **5** (114 мг, 83%) выделили в виде белых кристаллов. УФ (H₂O, pH 8) λ_{\max} : 262.5 нм (ϵ 15000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, J = 15.0, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.72 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 16.52 с.

(±)-9-[цис-4'-(Имидазолидофосфонил)метиленоксициклопент-2'-енил]гуанин (11). К раствору фосфоната **5** (32.7 мг, 0.1 ммоль) в 1 мл воды добавили сухой ДМФА (2 мл), ГМФА (2 мл) и трибутиламин (220 мкл, 0.9 ммоль). Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме до объема 3 мл, добавили сухой ДМФА (2 мл) и раствор снова сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем при перемешивании в токе аргона добавили КДИ (130 мг, 0.8 ммоль), и смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система С). К раствору добавили MeOH (65 мкл, 2 ммоль) и после 20 минут перемешивания удалили метанол в вакууме. Полученный раствор использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

(±)-P,P'-Бис{[цис-4'-(гуанин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}дифосфат (12) и (±)-9-[цис-4'-(дифосфорилфосфометиленокси)циклопент-2'-енил]-гуанин (13). К раствору имидазолида **11** (0.1 ммоль) в смеси ДМФА (1 мл) и ГМФА (2 мл) при перемешивании в токе аргона добавили бис-трибутиламмонийную соль пиродифосфата (400 мкл 0.5М раствора в ДМФА) и перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система D). Реакционную смесь разбавили водой до 100 мл и делили на колонке с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH₄HCO₃ (0-0.4 М), трифосфонат **13** элюировали 0.30 М NH₄HCO₃, а целевой продукт **12** - 0.35 М NH₄HCO₃. Продукты дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Целевые фракции лиофилизировали и получили 19 мг (24%) продукта **12** и 28 мг (57%) трифосфоната **13**. В качестве побочных продуктов выделили 3 мг (5%) **(±)-P,P'-бис[цис-4'-(гуанин-9-**

ил)циклопент-2'-енилоксиметил]дифосфоната (14) и 1 мг (3%) (\pm)-9-{*цис*-[4'-(метил)фосфонометиленокси]циклопент-2'-енил}гуанин (15).

Соединение **12**. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 252.2 нм (ϵ 18000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.3 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (1H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 8.8 (д, J = 22 Гц, P $_{\alpha}$), -22.7 (д, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 796.1 [M⁺].

Трифосфонат **13**. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 252.5 нм (ϵ 10300). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.3 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (1H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 7.8 (д, J = 27 Гц, P $_{\alpha}$), -7.8 (д, J = 20 Гц, P $_{\gamma}$), -22.8 (дд, J = 27 Гц, J = 20 Гц, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 487.3 [M⁺].

Димер **14**. УФ (H₂O, pH 7): λ_{\max} 252.3 нм. ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.3 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (0.5 H, с, 8-H), 7.85 (0.5 H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 8.6 с.

Метиловый эфир **15**. УФ (H₂O, pH 7): λ_{\max} 251.6 нм. ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.3 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.54 (3H, д, J = 10.3 Гц, POCH₃), 3.69 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (1H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 18.15 с.

(\pm)-P,P'-Бис{[*цис*-4'-(гуанин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}фосфат 16.

К раствору имидазолида **11** (0.1 ммоль) в смеси ДМФА (1 мл) и ГМФА (2 мл) при перемешивании в токе аргона добавили трибутиламмонийную соль ортофосфата (200 мкл 1М раствора в ДМФА) и перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система D). Реакционную смесь разбавили водой до 100 мл и делили на колонке с DEAE-Toyorearl; элюировали линейным градиентом NH₄HCO₃ (0-0.4 М). Целевой продукт **16** элюировали 0.33 М NH₄HCO₃. Продукт дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Фракции, содержащие продукт **16**, лиофилизировали и получили 13 мг (36%) целевого продукта **16**. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 250.2 нм (ϵ 16000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.3 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-

H), 7.83 (0.5 H, c, 8-H), 7.85 (0.5 H, c, 8-H); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 9.1 (д, $J = 27$ Гц, P_α), - 22.3 (т, P_β). Масс-спектр (m/e): 716.1 [M^+].

(\pm)-P,P'-Бис{[*цис*-4'-(гуанин-9-ил)циклопент-2'-

енил]оксиметилфосфонил}дифторметилендифосфонат (18) и (\pm)-9-[4'-[*цис*-(дифторметилендифосфонил)фосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]гуанин (17).

Метод А. К раствору имидазолида **11** (0.1 ммоль) в смеси ДМФА (1 мл) и ГМФА (2 мл) при перемешивании в токе аргона добавили бис-трибутиламмонийную соль дифторметилендифосфоновой кислоты (300 мкл 0.5М раствора в ДМФА) и раствор перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система D). Реакционную смесь разбавили водой до 100 мл и делили на колонке с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.4 М), трифосфонат **17** элюировали 0.30 М NH_4HCO_3 , а целевой продукт **18** - 0.35 М NH_4HCO_3 . Продукты дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Целевые фракции лиофилизировали и получили 13 мг (31%) продукта **18** и 6 мг (11%) трифосфоната **17**. В качестве побочного продукта выделили 6 мг (19%) димера **14**.

Метод В. К раствору дифторметилендифосфоновой кислоты (21.2 мг, 0.1 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавили трибутиламин (220 мкл, 0.9 ммоль), реакционную смесь сконцентрировали в вакууме и снова разбавили ДМФА (2 мл) и при перемешивании в токе аргона добавили КДИ (260 мг, 1.6 ммоль). Смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре, затем добавили MeOH (104 мкл, 3.2 ммоль) и раствор перемешивали еще 20 минут, а затем метанол удалили в вакууме. Полученный раствор бисимидазолида дифторметилендифосфоновой кислоты **19** использовали в последующей реакции без дополнительной очистки.

К раствору фосфоната **5** (163.5 мг, 0.5 ммоль) в 1 мл воды добавили ДМФА (2 мл), ГМФА (2 мл) и трибутиламин (1.1 мл, 4.5 ммоль). Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме до объема 3 мл, добавили ДМФА (2 мл) и снова сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем при перемешивании в токе аргона добавили полученный раствор к раствору бисимидазолида дифторметилендифосфоновой кислоты **19** (0.1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 12 часов при комнатной температуре, а затем разбавили водой до 100 мл и делили на колонке с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.4 М). Трифосфонат **17** элюировали 0.30 М NH_4HCO_3 , а целевой продукт **18** - 0.35 М NH_4HCO_3 . Продукты дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали

водой. Целевые фракции лиофилизировали и получили 29 мг (35%) продукта **18** и 16 мг (31%) трифосфоната **17**.

Метод С. К раствору имидазолида **11** (0.1 ммоль) в смеси ДМФА (1 мл) и ГМФА (2 мл) при перемешивании в токе аргона добавили бис-трибутиламмонийную соль дифторметилендифосфоновой кислоты (600 мкл 0.5М раствора в ДМФА). После 12-часового перемешивания при комнатной температуре реакционную смесь разбавили водой до 100 мл, нанесли на колонку с DEAE-Toyopearl и элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.4 М). Целевой трифосфонат **17** элюировали 0.30 М NH_4HCO_3 , а продукт **18** - 0.35 М NH_4HCO_3 . Продукты дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichroprep RP-18, элюировали водой. Целевые фракции лиофилизировали и получили 1.3 мг (3%) продукта **18** и 36.5 мг (70%) трифосфоната **17**. Кроме того, выделили 6 мг (19%) димера **14**.

К раствору трифосфоната **17** (36.5 мг, 0.07 ммоль) в 2 мл воды добавили трибутиламин (154 мкл, 0.06 ммоль), ГМФА (1мл) и ДМФА (2 мл), реакционную смесь сконцентрировали в вакууме и снова добавили ДМФА (2 мл). Эту процедуру повторили три раза, а затем при перемешивании в токе аргона добавили к полученному раствору раствор имидазолида **11** (0.15 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 12 часов при комнатной температуре. Продукт **18** был выделен и очищен так же, как в методе А и получен с выходом 55% (31.5 мг).

Соединение **18**. УФ (H_2O , pH 8): λ_{max} 252.2 нм (ϵ 18000). ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, $J = 14.3$ и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, $J = 14.3$ и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH_2P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (0.5 H, с, 8-H), 7.85 (0.5 H, с, 8-H); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 10.4 (д, $J_{\text{P}\alpha,\text{P}\beta} = 17$ Гц, P_α), -5.7 (дт, $J_{\text{P}\beta,\text{F}} = 84$ Гц, P_β). ^{19}F ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -42.6 (т, $J_{\text{F,P}} = 84$ Гц). Масс-спектр (m/e): 830.3 [M^+].
Трифосфонат **17**. УФ (H_2O , pH 8): λ_{max} 252.5 нм (ϵ 10300). ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, $J = 14.3$ и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, $J = 14.3$ и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.69 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH_2P), 5.08 (1H, м, 4'-H), 5.32 (1H, м, 1'-H), 6.15 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.83 (1H, с, 8-H); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 10.3 (д, $J_{\text{P}\alpha,\text{P}\beta} = 33$ Гц, P_α), 3.8 (дт, $J_{\text{P}\gamma,\text{P}\beta} = 59$ Гц, $J_{\text{P}\gamma,\text{F}} = 82$ Гц, P_γ), -4.7 (ддт, $J_{\text{P}\beta,\text{F}} = 88$ Гц, P_β). ^{19}F ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -42.6 (дд, $J_{\text{F,P}\gamma} = 82$ Гц, $J_{\text{F,P}\beta} = 88$ Гц). Масс-спектр (m/e): 519.9 [M^+].

(\pm)-*P,P'*-Бис{[*цис*-4'-(гуанин-9-ил)циклопент-2'-

енил]оксиметилфосфонил}дибромметилендифосфонат (**20**) и (\pm)-9-[*цис*-4'-(дибромметилендифосфонилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]гуанин

синтезировали и выделили по методу А аналогично соединениям **17** и **18**. Выход целевого продукта **20** составил 35%, а трифосфоната - 12%.

Соединение **20**. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 251.2 нм (ϵ 18000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.90 (1H, дт, J = 14.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.04 (1H, м, 5' α -H), 3.96 (2H, д, J = 9.4 Гц, OCH₂P), 4.85 (1H, м, 4'-H), 5.25 (1H, м, 1'-H), 6.10 (1H, м, 2'-H), 6.40 (1H, м, 3'-H), 7.85 (1H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.7 (д, J = 26 Гц, P $_{\alpha}$), -0.8 (д, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 952.6 [M⁺].

(\pm)-9-[цис-4'-(дибромметилendifосфонилфосфонометиленокси)циклопент-2'-

енил]гуанин. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 251.5 нм (ϵ 10300). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.94 (1H, дт, J = 14.4 и 4.0 Гц, 5' β -H), 2.99 (1H, дт, J = 14.4 и 7.2 Гц, 5' α -H), 3.96 (2H, д, J = 9.4 Гц, OCH₂P), 4.87 (1H, м, 4'-H), 5.35 (1H, м, 1'-H), 6.13 (1H, м, 2'-H), 6.42 (1H, м, 3'-H), 7.85 (1H, с, 8-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.7 (д, $J_{P_{\alpha}, P_{\beta}}$ = 34 Гц, P $_{\alpha}$), 8.4 (д, $J_{P_{\gamma}, P_{\beta}}$ = 14 Гц, P $_{\gamma}$), 2.5 (дд, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 643.2 [M⁺].

(\pm)-P,P'-Бис{[цис-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}дифосфат (21**) и (\pm)-9-[цис-4'-(дифосфорилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин.**

Имидазолид фосфоната **10** получили по схеме, описанной для имидазолида **11**, исключив ГМФА.

Продукт **21** с выходом 16% получили аналогично соединению **12** из соответствующего имидазолида фосфоната **10** и бис-трибутиламмонийной соли пирофосфата. Кроме того, получили 23% **(\pm)-9-[цис-4'-(дифосфорилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденина** и 12% **(\pm)-P,P'-бис[цис-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енилоксиметил]дифосфоната.**

Соединение **21**. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 261.3 нм (ϵ 27000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, J = 15.0, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.72 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.5 (д, J = 22 Гц, P $_{\alpha}$), -22.7 (д, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 764.1 [M⁺].

(\pm)-9-[цис-4'-(дифосфорилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 261.5 нм (ϵ 15000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, J = 15.0, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.72 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.9 (д, J = 26 Гц, P $_{\alpha}$), -9.6 (д, J = 20 Гц, P $_{\gamma}$), -22.7 (дд, P $_{\beta}$). Масс-спектр (m/e): 471.2 [M⁺].

(±)-*P,P'*-бис[*цис*-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енилоксиметил]дифосфонат. УФ (H₂O, pH 7.5): λ_{\max} 261.5 нм. ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.82 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 8.4 с.

(±)-*P,P'*-Бис{[*цис*-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}дифторметилендифосфонат (22) и (±)-9-[*цис*-4'-((дифторметилендифосфонил)фосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин.

Продукт 22 получили и выделили аналогично соединению 18 (метод А), выход составил 27%. В качестве побочных продуктов получили (±)-9-[*цис*-4'-((дифторметилендифосфонил)фосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин (24%) и (±)-*P,P'*-бис[*цис*-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енилоксиметил]дифосфонат (17%).

Соединение 22. УФ (H₂O, pH 8) λ_{\max} 261.4 нм (ϵ 27000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, J = 15.0, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.72 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.7 (д, J = 21 Гц, P _{α}), -6.1 (дт, $J_{P\beta,F}$ = 84 Hz, P _{β}). ¹⁹F ЯМР (D₂O, δ , м.д.): -42.6 (т, $J_{F,P}$ = 84 Гц). Масс-спектр (m/e): 798.1 [M⁺].

(±)-9-[*цис*-4'-((дифторметилендифосфонил)фосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин. УФ (H₂O, pH 8): λ_{\max} 261.5 нм (ϵ 15000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.97 (1H, м, J = 15.0, 8.0 и 4.0 Гц, 5' β -H), 3.02 (1H, м, 5' α -H), 3.72 (2H, д, J = 9.0 Гц, OCH₂P), 4.95 (1H, м, 4'-H), 5.50 (1H, м, 1'-H), 6.23 (1H, м, 2'-H), 6.47 (1H, м, 3'-H), 8.14 (1H, с, 8-H), 8.18 (1H, с, 2-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 9.6 (д, $J_{P\alpha,P\beta}$ = 34 Гц, P _{α}), 4.0 (дт, $J_{P\gamma,P\beta}$ = 57 Гц, $J_{P\gamma,F}$ = 91 Гц, P _{γ}), -2.9 (ддт, $J_{P\beta,F}$ = 95 Гц, P _{β}). ¹⁹F ЯМР (D₂O, δ , м.д.): -42.6 (дд, $J_{F,P\gamma}$ 91 Гц, $J_{F,P\beta}$ = 95 Гц). Масс-спектр (m/e): 504.9 [M⁺].

(±)-*P,P'*-Бис{[*цис*-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}дибромметилендифосфонат (23) и (±)-9-[*цис*-4'-(дибромметилендифосфонилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин

синтезировали и выделили по методу С. Выход трифосфоната составил 68%, а целевого продукта 20 - 21% в расчете на монофосфонат 10.

(±)-9-[*цис*-4'-(дибромметилендифосфонилфосфонометиленокси)циклопент-2'-енил]аденин УФ: λ_{\max} 262.5 нм (ϵ 27 000). ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д.): 1.98 (1H, дт, J = 14.3 и 4.0 НГц, 5' α -H), 3.09 (1H, дт, J = 14.3 и 7.8 Гц, 5' β -H), 3.96 (2H, д, J = 9.4 Гц, OCH₂H), 4.90 (1H, м, 4'-H), 5.55 (1H, м, 1'-H), 6.21 (1H, м, 2'-H), 6.49 (1H, м, 3'-H), 8.21 (1H, с, 8-H), 8.25

(1H, с, 2-Н). ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д): 9.6 (д, $J_{\text{P}\beta, \text{P}\alpha} = 33$ Гц, P_α), 8.6 (д, $J_{\text{P}\gamma, \text{P}\beta} = 14$ Гц, P_γ), 2.9 (dd, P_β). Масс-спектр (m/e): 627.7 [M^+].

Соединение **23**. УФ: λ_{max} 262.2 нм (ϵ 27 000). ^1H -NMR (D_2O , δ , м. д): 1.89 (1H, м, 5' α -H), 3.02 (1H, м, 5' β -H), 3.93 (2H, д, $J = 10$ Гц, OCH_2H), 4.84 (1H, м, 4'-H), 5.39 (1H, м, 1'-H), 6.08 (1H, м, 2'-H), 6.41 (1H, м, 3'-H), 8.05 (1H, с, 8-H), 8.08 (0.5H, с, 2-Н), 8.10 (0.5H, с, 2-Н). ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д): 9.8 (д, $J = 26$ Гц, P_β), -0.8 (д, P_α). Масс-спектр (m/e): 919.9 [M^+].

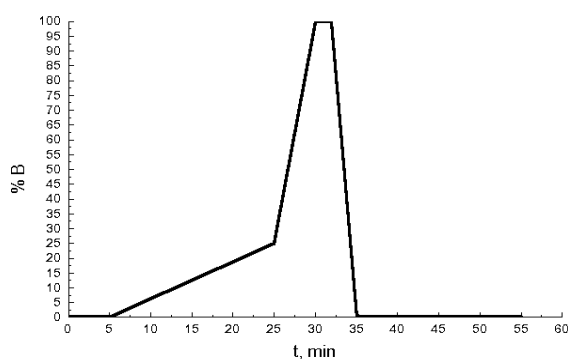
(\pm)-P,P'-Бис{[цис-4'-(аденин-9-ил)циклопент-2'-енил]оксиметилфосфонил}фосфат

(24). Продукт **24** получили и выделили аналогично соединению **16**, выход составил 42%.

УФ (H_2O , pH 8): λ_{max} 261.3 нм (ϵ 25000). ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1.87 (1H, м, 5' β -H), 2.98 (1H, м, 5' α -H), 3.84 (2H, д, $J = 9.0$ Гц, OCH_2P), 4.65 (1H, м, 4'-H), 5.35 (1H, м, 1'-H), 6.03 (1H, м, 2'-H), 6.37 (1H, м, 3'-H), 8.07 (0.5H, с, 8-H), 8.09 (0.5H, с, 8-H), 8.11 (0.5H, с, 2-Н), 8.13 (0.5H, с, 2-Н); ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 9.1 (д, $J = 24$ Гц, P_α), -22.4 (д, P_β). Масс-спектр (m/e): 684.2 [M^+].

3.1.1.2. Оценка стабильности карбоциклических аналогов динуклеозиддифосфонатдифосфатов и динуклеозидтетрафосфонатов в сыворотке крови человека

Пуповинная сыворотка крови человека была любезно предоставлена проф. В. Черниковым (Институт биологии гена, РАН). Исследуемые соединения в концентрациях 0,5 мМ инкубировали со 100% пуповинной сывороткой крови человека при 37°C. Через определенные промежутки времени (5 минут для dGTP и 1 час для соединений **12**, **17** и **18**) отбирали аликвоты и останавливали процесс гидролиза, замораживая образец в жидком азоте. Образец центрифугировали (6 мин при 12 000 оборотах в минуту), супернатант анализировали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с Nucleosil 100 RP-18 (0.5 μ , 4 x 15 мм), элюируя 0.05 М триэтиламмоний бикарбонатным буфером (pH 7.5-8.0) в градиенте 70% этанола. Профиль градиента показан на рисунке 29.



A - 0.05 М ТЭАБ буфер (pH 7.5-8.0),

B - 70% EtOH

Рис 29. Профиль градиента.

3.1.1.3. Оценка биологической активности карбоциклических аналогов динуклеозидифосфонатдифосфатов и динуклеозидтетрафосфонатов

Эксперименты по ингибированию синтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ в бесклеточных системах были проведены к.б.н. Л. С. Викторовой, ИМБ РАН, методика опубликована[235, 236]. Испытания соединений на клетках Rat1, инфицированных рекомбинантным ретровирусом (pSG1), содержащим ген обратной транскриптазы вируса MLV было проведено к.х.н. Л. Е. Горюновой, Институт экспериментальной кардиологии, Всероссийский кардиологический центр, РАМН, методика опубликована[235, 236]. Тестирование соединений на клетках MT-4, инфицированных ВИЧ было проведено в лаборатории проф. А. Г. Покровского, НПО "Вектор", Новосибирск, методика опубликована[235, 236]. Оценка синтезированных соединений в качестве ингибиторов теломеразы была проведена д.б.н. Е. Е. Егоровым, ИМБ РАН, методика опубликована[237].

3.1.2. Методики к разделу 2.1.2.

В данной части работы были использованы коммерчески доступные реактивы и растворители (Acros, Aldrich и Fluka). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) элюировали: CHCl₃-MeOH, 98:2 (система А); CHCl₃-MeOH, 95:5 (система Б), Диоксан-NH₃, 4:1 (система В), изопропанол-NH₃-вода, 7:2:1 (система Г). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel 40-63 мкм (Merck), системы для элюции указаны в тексте. УФ спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония). Спектры ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР и ³¹P-ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H -ЯМР, 100 МГц для ¹³C-ЯМР (приведены химические сдвиги относительно внутренних стандартов - Me₄Si для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоната натрия для D₂O) и 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия; приведены химические сдвиги относительно внешнего стандарта – 85% фосфорной кислоты). Хим. сдвиги приведены в миллионных долях, а константы спин-спинового взаимодействия в герцах. Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II или maXis (Bruker, Германия) методом электрораспылительной ионизации (HRESIMS). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) или отрицательных (напряжение на капилляре 3200 V) ионах. Диапазон сканирования масс - m/z 50 - 3000 Д, калибровка - внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в ацетонитриле, скорость потока - 3 мкл/мин. Газ-распылитель -

азот (4 л/мин), температура интерфейса - 180°C. Масс спектры регистрировали на приборах Hewlett Packard 5973 MSD и FINNIGAN POLARIS Q mass-spectrometers (температура интерфейса - 250 °C). Оптическое вращение измеряли на приборе 341 Polarimeter (Perkin–Elmer, США) при $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-715 (Jasco, Япония) в 1 см кювете при 20°C в буфере $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 95:5. Результаты описаны величиной молярного адсорбционного коэффициента $\Delta\epsilon = \theta/(32980Cl)$ см²/моль, где θ - молярная эллиптичность в градусах, C – молярная концентрация (моль/л) и l – оптический путь в см. Температуры плавления измеряли на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США)

3.1.2.1. Синтез производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, несущих модификации в 3,5,6 и/или 4' положениях.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-урацил (25) был получен в соответствии с общей методикой получения 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов (см. 3.1. Общие методы к разделу 2.1.), в качестве основания использовали урацил (1 г, 8.9 ммоль). Получили 780 мг продукта **25** в виде мелких светло-желтых кристаллов. Выход 42%. $T_{\text{пл}} = 190.5\text{-}191.0^\circ\text{C}$. ¹H-ЯМР (CD_3OD): 7.57-7.55 (1H, д, $J = 7.99$ Гц, H6), 6.23-6.22 (1H, д, $J = 5.55$ Гц, H2'), 5.86-5.84 (1H, д, $J = 5.54$ Гц, H3'), 5.71-5.69 (1H, д, $J = 7.99$ Гц, H5), 5.53-5.49 (1H, м, H1'), 4.50 (1H, м, H4'), 2.93-2.85 (1H, м, H_a5'), 1.51-1.47 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CD_3OD): 166.31, 152.79 (C-4, C-2), 143.59 (C-6), 140.98, 132.10 (C-2', C-3'), 102.92 (C-5), 73.34 (C-1'), 60.43 (C-4'), 41.27 (C-5'). HRESIMS: найдено m/z 195.0763, рассчитано для $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 195.0764; m/z 217.0580; рассчитано для $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 217.0584.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацил (26) был получен в соответствии с общей методикой получения 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов (см. 3.1. Общие методы к разделу 2.1.), в качестве основания использовали 6-метилурацил (800 мг, 6.1 ммоль). Получили 481 мг продукта в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 38%. $T_{\text{пл}} = 167.5\text{-}168.5^\circ\text{C}$. ¹H-ЯМР (DMSO-d_6): 11.03 (1H, с, NH), 5.80-5.79 (1H, м, H2'), 5.75-5.73 (1H, м, H3'), 5.59-5.57 (1H, м, H1'), 5.43 (1H, с, H5), 4.74 (1H, с, OH), 4.58-4.56 (1H, м, H4'), 2.50-2.49 (1H, м, H_a5'), 2.01 (3H, с, CH₃), 1.89-1.86 (1H, м, H_a5'). ¹³C-ЯМР (DMSO-d_6): 163.09, 151.37, 151.24 (C-4, C-6, C-2), 134.36, 131.97 (C-2', C-3'), 98.55.92 (C-5), 74.13 (C-1'), 53.93 (C-4'), 37.66 (C-5'), 17.82 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 209.0933, вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 209.0921; найдено m/z 231.0741; вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 231.0740.

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацил (27). К раствору **25** (75 мг, 0.38 ммоль) в сухом пиридине прибавляли бензоилхлорид (90 мкл, 0.77 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 2 часа при + 36°C, упаривали в вакууме водоструйного насоса досуха, остаток растворяли в 0.5 мл смеси CHCl₃-MeOH (98:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Продукт **27** получили в виде мелких бесцветных кристаллов, 88 мг (78%). T_{пл} = 174-174.5°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.75 (1H, с, NH), 8.05-8.03 (1H, м, H6), 7.92-7.91 (2H, м, H2'',H6''), 7.52 (2H, м, H3'',H5''), 7.40-7.38 (1H, м, H4''), 7.26-7.18 (1H, д, J = 8.06, H5), 6.37-6.36 (1H, д, J = 5.56 Гц, H2'), 5.97-5.96 (1H, д, J = 5.58 Гц, H3'), 5.84-5.83 (1H, м, H1'), 5.69-5.67 (1H, м, H4'), 3.05-3.01 (1H, м, H_a5'), 1.76-1.72 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CD₃Cl₃): 165.87, 163.10 (C-4, C-2), 150.92 (C-4''), 140.56 (C-6), 135.73, 134.23 (C-2', C-3'), 133.47 (C-1''), 129.63 (C-2'',C-6''), 128.63 (C-3'',C-5''), 103.12 (C-5), 76.78 (C-1'), 58.55 (C-4'), 37.65 (C-5'). MS (ESI) m/z 299.3 (M + H⁺), 321.5 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-метилурацил (28). Получали аналогично соединению **27**, исходя из **26**. Выделяли 88 мг продукта в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 78 %. T_{пл} = 186-187°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.21 (1H, с, NH), 8.05-8.03 (2H, м, H2'',H6''), 7.55-7.53 (1H, м, H6), 7.42-7.40 (2H, м, H3'', H5''), 6.03 (2H, м, H2', H3'), 5.91-5.88 (1H, м, H1', H4''), 5.50 (1H, д, J = 8.06 Гц, H5), 2.95-2.92 (1H, м, H_a5'), 2.40-2.34 (1H, м, H_b5'), 2.03(3H, с, 6-CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 166.51, 163.42 (C-4, C-2), 153.26 (C-4''), 150.10 (C-6), 135.69, 133.00 (C-2', C-3'), 129.79 (C-1''), 129.75 (C-2'',C-6''), 128.37 (C-3'',C-5''), 100.61 (C-5), 78.41 (C-1'), 55.17 (C-4'), 34.73 (C-5'), 18.48 (CH₃). MS (ESI) m/z 335.2 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензоилурацил (29). К соединению **27** (60 мг, 0.2 ммоль) в хлористом метиле прибавляли триэтиламин (25 мкл, 0.4 ммоль), 4-(N,N-диметиламино)пиридин (200 мг, 0.16 ммоль) и бензоилхлорид (46 мкл, 0.4 ммоль). Реакционную смесь оставляли на 18 часов, после чего упаривали в вакууме водоструйного насоса досуха, остаток растворяли в 1 мл смеси CHCl₃-MeOH (98:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Получили 32 мг **29** в виде бесцветного масла. Выход 40 %. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.94 (2H, м, H2'', H6''), 7.86 (2H, м, H2''', H6'''), 7.58-7.56 (2H, м, H4'', H4'''), 7.42-7.40 (4H, м, H3'', H5'', H3''', H5'''), 7.34 (1H, д, J = 8.14 Гц, H6), 6.40-6.39 (1H, д, J = 5.53 Гц, H2'), 6.01-5.99 (1H, д, J = 5.55 Гц, H3'), 5.84-5.83 (1H, м, H1'), 5.82-5.80 (1H, д, J = 8.14 Гц, H5), 5.68-5.66 (1H, м, H4'), 3.07-3.03 (1H, м, H_a5'), 1.84-1.79 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 168.82 (C''(O)), 165.87, 162.04 (C-4, C-2), 149.96 (C-4''), 140.32 (C-6), 137.11, 135.18 (C-2', C-3'), 134.02 (C-1''), 133.54 (C-1'''), 131.61 (C-4'''), 130.57 (C-2'', C-6''), 129.74 (C-3'',C-5''), 129.26 (C-2''', C-6'''), 128.68 (C3''', C-

5'''), 103.05 (C-5), 77.64 (C-1'), 67.18 (C'''(O)), 58.92 (C-4'), 37.70 (C-5'). MS (ESI) m/z 403.2 (M + H⁺), 425.4 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензоил-6-метилурацил (30). Получали аналогично соединению **29** исходя из соединения **28** с выходом 40 % (32 мг в виде желтого масла). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.92 (2H, м, H2'', H6''), 7.89-7.86 (2H, м, H2, H6 Bz), 7.65 (1H, м, H4), 7.53-7.49 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 7.36-7.34 (2H, м, H3, H5 Bz), 6.04 (1H, м, H2'), 6.01 (1H, м, H3'), 5.88-5.85 (1H, м, H1' H4'), 5.28 (1H, с, H5), 2.97-2.94 (1H, м, H_a5'), 2.34-2.27 (1H, м, H_b5'), 2.07 (3H, с, 6-CH₃). ¹³C-ЯМР: 167.15 (C''(O)), 163.85, 165.06 (C-4, C-2), 145.75 (C-4''), 141.68 (C-6), 136.17, 137.11 (C-2', C-3'), 134.13 (C-1''), 132.23 (C-1'''), 131.19 (C-4'''), 131.07 (C-2'', C-6''), 130.78 (C-3'', C-5''), 127.43 (C-2''', C-6'''), 124.45 (C3''', C-5'''), 103.55 (C-5), 73.46 (C-1'), 64.56 (C'''(O)), 55.80 (C-4'), 36.79 (C-5'), 33.17 (CH₃). MS (ESI) m/z 439.3 (M + Na).

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (31). К раствору **25** (40 мг, 0.21 ммоль) в 10 мл сухого ДМФА прибавляли свежепрокаленный K₂CO₃ и бензилбромид (32 мкл, 0.27). Реакционную массу перемешивали в течение 2 часов, после чего упаривали в вакууме масляного насоса досуха, остаток растворяли в 0.5 мл смеси CHCl₃-MeOH (98:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Получили 49 мг продукта **31** в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 82 %. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.40-7.38 (2H, м, H2'', H6''), 7.29-7.28 (1H, м, H6), 7.25-7.18 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 6.13-6.12 (1H, д, J = 5.54 Гц, H2'), 5.74-5.73 (1H, д, J = 5.45 Гц, H3'), 5.72-5.70 (1H, д, J = 8.01 Гц, H5), 5.45-5.43 (1H, м, H1'), 5.05-5.03 (2H, м, CH₂ Bn) 4.77-4.76 (1H, м, H4'), 2.81-2.77 (1H, м, H_a5'), 2.40 (1H, с, OH), 1.54-1.49 (1H, м, H_b5').

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-6-метилурацил (32) получали в виде бесцветного масла исходя из **26** по методике, описанной для соединения **31** с выходом 80 % (28 мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.68-7.60 (2H, м, H2'', H6''), 7.46-7.43 (1H, м, H6), 7.30-7.25 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 5.98-5.93 (1H, д, J = 5.54 Гц, H2'), 5.68-5.66 (1H, д, J = 5.45 Гц, H3'), 5.56-5.50 (1H, д, J = 8.01 Гц, H5), 5.11-5.08 (1H, м, H1'), 5.06-5.03 (2H, м, CH₂ Bn), 4.71-4.66 (1H, м, H4'), 2.98-2.91 (1H, м, H_a5'), 2.33-2.29 (1H, м, H_b5'), 2.13 (1H, с, OH), 2.04 (3H, с, 6-CH₃).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (33). К раствору **27** (30 мг, 0.1 ммоль) в 10 мл сухого ДМФА прибавляли свежепрокаленный K₂CO₃ (18 мг, 0.13 ммоль) и бензилбромид (17 мкл, 0.13 ммоль). Реакционную массу перемешивали в течение 2 часов, после чего упаривали в вакууме масляного насоса досуха, остаток растворяли в 0.5 мл смеси гексан-EtOAc (3:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя гексан-EtOAc (3:2). Получили 29 мг продукта **33** в виде мелких бесцветных кристаллов.

Выход 82%. $T_{пл} = 121-122.5^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.91-7.90 (2H, м, H2'', H6''), 7.50-7.42 (1H, м, H6), 7.40-7.35 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 7.23-7.17 (5H, м, Bn), 6.34-6.32 (1H, д, $J = 5.55$ Гц, H2'), 5.94-5.92 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H3'), 5.73-5.71 (1H, д, $J = 8.04$ Гц, H5), 5.81-5.79 (1H, м, H1'), 5.73-5.71 (1H, м, H4'), 5.08-5.05 (2H, м, CH_2) 3.04-3.00 (1H, м, H_a5'), 1.74-1.70 (1H, м, H_b5'). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 165.88 (C'' (O)), 162.62, 151.68 (C-4, C-2), 138.45 (C-6), 136.54, 134.41 (C-2', C-3'), 133.44 (C-4''), 129.63 (C-1'', C-2'', C-6''), 129.22 (C-3'', C-5''), 128.62 (C-1, C-2, C-6 Bn), 128.49 (C-3, C-5 Bn), 127.74 (C-4 Bn), 102.60 (C-5), 76.78 (C-1'), 59.38 (C-4'), 44.63 (CH_2 Bn), 37.76 (C-5'). MS (ESI) m/z 389.1 ($\text{M} + \text{H}^+$), 411.1 ($\text{M} + \text{Na}$).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензил-6-метилурацил (34) получали аналогично соединению **33**, исходя из **28**, с выходом 78% (31 мг), в виде мелких бесцветных кристаллов. $T_{пл} = 145-147^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.99 (2H, м, H2'', H6''), 7.44-7.42 (1H, м, H4''), 7.34-7.22 (5H, м, Bn), 7.09 (2H, м, H3'', H5''), 6.02 (1H, м, H2'), 5.98 (1H, м, H3'), 5.89-5.86 (2H, м, H1', H4'), 5.53 (1H, с, H5), 5.03 (2H, м, CH_2) 2.93-2.89 (1H, м, H_a5'), 2.34-2.33 (1H, м, H_b5'), 2.06 (3H, с, 6- CH_3). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 166.59 (C''(O)), 162.37, 152.07 (C-4, C-2), 136.04 (C-6), 132.84 (C-2'), 130.54 (C-4''), 129.86 (C-1'', C-2'', C-6''), 129.54 (C-3'), 129.10 (C-3'', C-5''), 128.29 (C-1, C-2, C-6 Bn), 127.87 (C-4 Bn), 126.25 (C-3, C-5 Bn), 102.12 (C-5), 78.23 (C-1'), 56.01 (C-4'), 47.75 (CH_2 Bn), 34.87 (C-5'), 19.95 (6- CH_3). MS (ESI) m/z 425.3 ($\text{M} + \text{Na}$).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(*n*-метилбензил)-урацил (35) получали исходя из **27** по методике описанной для **33** с выходом 65% (22 мг) в виде мелких бесцветных кристаллов. $T_{пл} = 156-157.5^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.90 (2H, м, H2'', H6''), 7.50-7.44 (1H, м, H4''), 7.36-7.31 (3H, м, H3'', H5'', H6), 7.18-7.15 (2H, м, H2'', H6'''), 7.04-7.02 (2H, м, H3''', H5'''), 6.33-6.31 (1H, м, H2'), 5.93-5.91 (1H, м, H3'), 5.80-5.78 (1H, м, H1'), 5.72 (1H, м, H5), 5.69-5.67 (1H, м, H4'), 5.03-5.00 (2H, м, CH_2), 3.04-2.97 (1H, м, H_a5'), 2.23 (3H, с, 4'''- CH_3), 1.74-1.69 (1H, м, H_b5'). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 165.86 (C''(O)), 162.62, 151.64 (C-4, C-2), 138.36 (C-4''), 138.36 (C-6), 136.47 (C-2'), 134.43 (C-3'), 133.42 (C-4'''), 129.62 (C-1'', C-2'', C-6''), 129.28 (C-3'', C-5''), 129.14 (C-1''', C-2''', C-6'''), 128.60 (C-3''', C-5'''), 102.60 (C-5), 77.50 (C-1'), 59.32 (C-4'), 44.34 (CH_2), 37.73 (C-5'), 21.20 (4'''- CH_3). MS (ESI) m/z 403.2 ($\text{M} + \text{H}^+$), 425.4 ($\text{M} + \text{Na}$).

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(2''',4'''-диметилбензил)-урацил (36) получали исходя из **27** по методике описанной для **33** с выходом 72% (24 мг) в виде желтоватого масла. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.92 (2H, м, H2'', H6''), 7.51-7.49 (1H, м, H4''), 7.40 (2H, м, H3'', H5''), 7.23-7.21 (1H, д, $J = 8.04$ Гц, H6), 6.93-6.91 (2H, м, H3''', H5'''), 6.85 (1H, м, H6'''), 6.35-6.33 (1H, м, H2'), 5.96-5.95 (1H, м, H3'), 5.82-5.80 (1H, м, H1'), 5.72 (1H, д, $J = 8.03$ Гц, H5), 5.70-5.66 (1H, м, H4'), 5.05-5.02 (2H, м, CH_2), 3.04-3.00 (1H, м, H_a5'), 2.35 (3H, с, 2'''-

CH₃), 2.19 (3H, с, 4'''-CH₃), 1.76-1.72 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 165.88 (C''(O)), 162.75, 151.70 (C-4, C-2), 138.49 (C-6), 136.81 (C-4''), 136.51 (C-2'), 135.96 (C-4'''), 134.46 (C-3'), 131.25 (C-3'', C-5''), 129.82 (C-1'', C-2'', C-6''), 128.63 (C-1''', C-2''', C-6'''), 126.77 (C3''', C-5'''), 102.53 (C-5), 77.51 (C-1'), 59.38 (C-4'), 41.85 (CH₂), 37.78 (C-5'), 21.02 (2'''-CH₃), 19.35 (4'''-CH₃). MS (ESI) *m/z* 417.3 (M + H⁺), 439.3 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3''',5'''-диметилбензил)-урацил (37)

получали исходя из **27** по методике описанной для **33** с выходом 85% (121 мг) в виде мелких бесцветных кристаллов. T_{пл.} = 144-144.5°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.97 (2H, м, H2'', H6''), 7.57-7.55 (1H, м, H4''), 7.46-7.44 (2H, м, H3'', H5''), 7.25-7.24 (2H, м, H6, H4'''), 7.08 (2H, м, H2''', H6'''), 6.40-6.39 (1H, м, H2'), 6.01-5.99 (1H, м, H3'), 5.88 (1H, м, H1'), 5.80-5.78 (1H, д, H5), 5.75-5.74 (1H, м, H4'), 5.07-5.03 (2H, м, CH₂) 3.10-3.06 (1H, м, H_a5'), 2.27 (6H, с, 2CH₃), 1.81-1.77 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 165.87 (C''(O)), 162.68, 151.65 (C-4, C-2), 138.38 (C-6), 137.99 (C-4''), 136.69 (C-4'''), 136.47 (C-2'), 134.47 (C-3'), 133.42 (C-1''), 129.81 (C-2'', C-6''), 129.62 (C-3'', C-5''), 128.61 (C-1''', C-2''', C-6'''), 126.89 (C3''', C-5'''), 102.61 (C-5), 78.27 (C-1'), 59.35 (C-4'), 44.56 (CH₂), 37.76 (C-5'), 21.33 (3'', 5'' 2CH₃). MS (ESI) *m/z* 417.2 (M + H⁺), 439.3 (M + Na).

(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3''',5'''-дифторбензил)-урацил (38)

получали исходя из **27** по методике описанной для **33** в виде масла с выходом 94% (48 мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.93-7.91 (2H, м, H2'', H6''), 7.51 (1H, м, H4''), 7.37 (2H, м, H3'', H5''), 7.23-7.21 (1H, д, *J* = 8.06 Гц, H6), 6.92-6.90 (2H, м, H2''', H6'''), 6.63-6.62 (1H, м, H4'''), 6.36-6.35 (1H, д, *J* = 5.55 Гц, H2'), 5.96-5.95 (1H, д, *J* = 5.55 Гц, H3'), 5.82-5.80 (1H, м, H1'), 5.75-5.73 (1H, д, *J* = 8.05 Гц, H5), 5.69-5.67 (1H, м, H4'), 5.02-5.00 (2H, д, *J* = 4.46 Гц, CH₂ Bn(F)₂), 3.04 (1H, м, H_a5'), 1.76-1.72 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 165.86 (C''(O)), 162.37, 149.16 (C-4, C-2), 138.83 (C-6), 137.76, 134.20 (C-2', C-3'), 133.46 (C-4''), 129.62 (C-1'', C-2'', C-6''), 128.62 (C-1''', C-2''', C-6'''), 111.29 (C-3''), 111.73 (C-5''), 103.24 (C3''', C-5'''), 102.99 (C-4'''), 102.47 (C-5), 76.77 (C-1'), 59.53 (C-4'), 43.89 (CH₂ Bn), 37.75 (C-5'). MS (ESI) *m/z* 425.2 (M + H⁺), 447.2 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(*n*-метилбензил)-6-метилурацил (39)

получали исходя из **28** по методике описанной для **34** в виде мелких светло-желтых кристаллов с выходом 66% (21 мг). T_{пл.} = 105-106.5°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.01-7.99 (2H, м, H2'', H6''), 7.44 (1H, м, H4''), 7.34-7.32 (2H, м, H3'', H5''), 7.05 (2H, м, H2, H6 Bn), 6.99 (2H, м, H3, H5 Bn), 6.02 (1H, м, H2'), 5.98 (1H, м, H3'), 5.88-5.86 (2H, м, H1', H4'), 5.51 (1H, с, H5), 4.98 (2H, м, CH₂) 2.92-2.85 (1H, м, H_a5'), 2.34-2.31 (1H, м, H_b5'), 2.24 (3H, с, CH₃ Bn), 2.08 (3H, с, 6-CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 166.61 (C''(O)), 162.42, 152.26 (C-4, C-2), 137.63 (C-4''), 136.09 (C-6), 133.18 (C-4 Bn), 132.84 (C-2'), 129.88 (C-1'', C-2'', C-6''), 129.74 (C-3'', C-

5''), 129.49 (C-3'), 128.29 (C-1, C-2, C-6 Bn), 126.32 (C-3, C-5 Bn), 102.07 (C-5), 78.27 (C-1'), 56.01 (C-4'), 47.59 (CH₂ Bn), 34.87 (C-5'), 21.12 (CH₃ Bn), 19.95 (6-CH₃). MS (ESI) m/z 439.3 (M + Na).

1-(4'-Бензоилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3''',5'''-диметилбензил)-6-метилурацил (40) получали исходя из **28** по методике, описанной для **34**. Выход 78% (108 мг, в виде мелких бесцветных кристаллов). $T_{пл} = 143.5-145^{\circ}\text{C}$. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.06-8.05 (2H, м, H2'', H6''), 7.50 (1H, м, H4''), 7.40-7.36 (2H, м, H3'', H5''), 6.88 (1H, м, H4'''), 6.72 (2H, м, H2''', H6'''), 6.09 (1H, м, H2'), 6.04-6.02 (1H, м, H3'), 5.96-5.93 (2H, м, H1', H4'), 5.59 (1H, с, H5), 5.01 (2H, м, CH₂) 2.97-2.94 (1H, м, H_a5'), 2.41-2.38 (1H, м, H_b5'), 2.25 (6H, с, 2CH₃), 2.14 (3H, с, 6-CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 166.60 (C''(O)), 162.48 (C-4''), 152.27, 138.71 (C-4, C-2), 136.09 (C-6), 132.83 (C-2'), 130.54 (C-4'''), 129.85 (C-1'', C-2'', C-6''), 129.80 (C-3'', C-5''), 129.49 (C-3'), 128.27 (C-1''', C-2''', C-6'''), 123.94 (C3''', C-5'''), 102.03 (C-5), 78.27 (C-1'), 56.02 (C-4'), 47.71 (CH₂ Bn), 34.86 (C-5'), 20.01 (3'''CH₃), 21.38 (5'''CH₃), 18.49 (6-CH₃). MS (ESI) m/z 453.3 (M + Na).

Получение хлорангидридов фенилкарбоновых кислот.

Фенилуксусную кислоту (500 мг, 3.6 ммоль) или гидрокоричную кислоту (800 мг, 5.3 ммоль) кипятили в тионилхлориде (15 мл) с обратным холодильником в течение 4 часов, а затем раствор концентрировали в вакууме водоструйного насоса. Остаток несколько раз переупаривали в CCl₄, и растворив в расчетном объеме CCl₄, вводили в последующие реакции.

1-(4'-Фенилацетокси-2'-циклопентен-1'-ил)-урацил (41). К раствору **25** (100 мг, 0.5 ммоль) в 10 мл сухого ДМФА добавляли хлорангидрид фенилуксусной кислоты (150 мкл, 1 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 18 часов при +36°C. Раствор упаривали в вакууме масляного насоса досуха, остаток растворяли в 0.5 мл CHCl₃ и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Получили 80 мг продукта **41** в виде бесцветного масла. Выход 52%. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.44 (1H, с, NH), 7.95 (1H, м, H4''), 7.24-7.20 (2H, м, H2'', H6''), 7.17 (2H, м, H3'', H5''), 6.88-6.86 (1H, д, $J = 8.05$ Гц, H6), 6.18-6.17 (1H, м, H2'), 5.86-5.85 (1H, м, H3'), 5.59-5.57 (2H, м, H1', H4'), 5.52-5.50 (1H, д, $J = 8.05$ Гц, H5), 3.56 (2H, м, CH₂), 2.86-2.84 (1H, м, H_a5'), 1.53-1.49 (1H, м, H_b5').

1-(4'-Фенилпропаноилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-урацил (42) получали и выделяли по методике описанной для **41** исходя из соединения **25** и хлорангидрида гидрокоричной кислоты с выходом 49 % (49 мг в виде бесцветного масла). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.37 (1H, с, NH), 7.26-7.25 (2H, м, H2'', H6''), 7.18-7.17 (2H, м, H3'', H4'', H5''), 7.07-7.05 (1H, д, $J = 8.03$ Гц, H6), 6.21-6.19 (1H, д, $J = 5.55$ Гц, H2'), 5.91-5.89 (1H, д, $J = 5.53$ Гц, H3') 5.70-5.68 (1H,

д, $J = 8.04$ Гц, H5), 5.64–5.61 (2H, м, H1', H4'), 2.96–2.92 (3H, м, CH_{2b}, H_a5'), 2.64–2.62 (2H, м, CH_{2a}), 1.53–1.47 (1H, м, H_b5').

1-(4'-(3-Цианобензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)урацил (43) получали и выделяли по методике описанной для **41** исходя из соединения **25** и хлорангидрида 3-цианобензойной кислоты в виде белых кристаллов с выходом 71% (114 мг). R_f 0.47 (CHCl₃ : MeOH, 98 : 2). Тпл. 197.5–198.5°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.81–1.78 (1H, дт, $J = 15.17$ Гц, $J = 4.19$ Гц, H_b-50), 3.21–3.16 (1H, дт, $J = 15.24$ Гц, $J = 7.93$ Гц, H_a-50), 5.74–5.73 (1H, м, H-10), 5.78–5.76 (1H, м, H-5), 5.91–5.89 (1H, м, H-40), 6.07–6.04 (1H, дд, $J = 2.27$ Гц, $J = 5.57$ Гц, H-3'), 6.41–6.38 (1H, м, H-2'), 7.24–7.23 (1H, д, $J = 8.08$ Гц, H-6), 7.61–7.58 (1H, м, H-5''), 7.87–7.84 (1H, м, H-4''), 8.23–8.21 (1H, м, H-6''), 8.29–8.28 (1H, м, H-2''), 9.06 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 37.78, 58.56, 78.38, 103.31, 113.33, 117.74, 129.71, 131.11, 133.36, 133.63, 134.63, 136.09, 136.40, 140.27, 150.88, 163.00, 164.01. HRESIMS m/z : рассчитано для C₁₇H₁₃N₃O₄ [M + H]⁺ 324.0979, найдено 324.0984; рассчитано для C₁₇H₁₃N₂O₄ [M + Na]⁺ 346.0798, найдено 346.0804.

1-(4'-(3,5-Диметилбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)урацил (44) и 1-(4'-(3,5-диметилбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3,5-диметилбензоил)урацил (53) получали по методике, аналогичной описанной для **41**. Реакция соединения **25** и хлорангидрида 3,5-диметилбензойной кислоты приводила к образованию смеси продуктов **44** и **53**, которые разделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃. Продукт **53** получили в виде бесцветного масла, выход 18% (21 мг). R_f 0.43 (CHCl₃). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.85–1.80 (1H, дт, $J = 15.39$ Гц, $J = 3.89$ Гц, H_b-5'), 2.28 (6H, с, 2 × CH₃), 2.30 (6H, с, 2 × CH₃), 3.05–3.02 (1H, дт, $J = 15.77$ Гц, $J = 8.13$ Гц, H_a-5'), 5.68–5.65 (1H, м, H-4'), 5.78–5.76 (1H, д, $J = 8.14$ Гц, H-5), 5.82–5.80 (1H, м, H-1'), 6.01–5.99 (1H, м, H-3'), 6.39–6.38 (1H, м, H-2'), 7.15 (1H, с, H-4''), 7.20 (1H, с, H-4'''), 7.37–7.35 (1H, д, $J = 8.14$ Гц, H-6), 7.46 (2H, с, H-2'', H-6''), 7.55 (2H, с, H-2''', H-6'''). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 21.26, 37.69, 58.91, 77.42, 103.01, 127.36, 128.26, 129.63, 131.58, 134.03, 135.16, 137.13, 138.40, 139.05, 140.40, 150.01, 162.11, 166.18, 169.11. HRESIMS m/z : рассчитано для C₂₇H₂₆N₂O₅ [M + H]⁺ 459.1914, найдено 459.1902; рассчитано для C₂₇H₂₆N₂O₅ [M + Na]⁺ 481.1734, найдено 481.1734.

Продукт **44** получили в виде серовато-белых кристаллов, выход 77% (65мг). R_f 0.30 (CHCl₃). Тпл. 166.5–168.3°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.83–1.79 (1H, дт, $J = 15.33$ Гц, $J = 3.50$ Гц, H_b-5'), 2.35 (6H, с, 2 × CH₃), 3.10–3.06 (1H, дт, $J = 15.72$ Гц, $J = 8.06$ Гц, H_a-5'), 5.75–5.73 (2H, м, H-4', H-5), 5.87–5.85 (1H, м, H-1'), 6.02–6.00 (1H, дд, $J = 2.07$ Гц, $J = 5.54$ Гц, H-3'), 6.42–6.40 (1H, м, H-2'), 7.20 (1H, с, H-4''), 7.34–7.32 (1H, д, $J = 8.05$ Гц, H-6), 7.59 (2H, с, H-2'', H-6''), 9.31 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 21.22, 37.62, 58.55, 77.42, 103.02, 127.33,

129.62, 134.14, 135.10, 136.82, 138.33, 140.74, 151.00, 163.30, 166.17. HRESIMS m/z : рассчитано для $C_{18}H_{18}N_2O_4$ $[M + Na]^+$ 349.1159, найдено 349.1151.

1-(4'-(3,5-Дихлорбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)урацил (45) и 1-(4'-(3,5-дихлорбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3,5-дихлорбензоил)урацил (54)

получали по методике, аналогичной описанной для **41**. Реакция соединения **25** и хлорангидрида 3,5-дихлорбензойной кислоты приводила к образованию смеси продуктов **45** и **54**, которые разделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя $CHCl_3$. Продукт **54** получили в виде белой пены, выход 20% (60 мг). R_f 0.41 ($CHCl_3$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.84–1.79 (1H, дт, $J = 15.30$ Гц, $J = 3.46$ Гц, H_b-5'), 3.15–3.07 (1H, дт, $J = 15.53$ Гц, $J = 7.95$ Гц, H_a-5'), 5.66–5.63 (2H, м, H-4', H-5), 5.84–5.81 (1H, м, H-1'), 6.08–6.04 (1H, м, H-3'), 6.39–6.37 (1H, м, H-2'), 7.32–7.30 (1H, д, $J = 8.16$ Гц, H-6), 7.52–7.51 (1H, м, H-4''), 7.57–7.56 (1H, м, H-4'''), 7.71 (2H, м, H-2'', H-6''), 7.81–7.80 (2H, м, H-2''', H-6'''). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 37.73, 59.05, 78.26, 103.17, 128.10, 128.60, 132.52, 133.36, 134.24, 134.84, 135.68, 136.29, 136.78, 140.50, 149.74, 161.78, 163.60, 167.13. HRESIMS m/z : рассчитано для $C_{23}H_{14}C_{14}N_2O_5$ $[M + H]^+$ 540.9703, найдено 540.9709; рассчитано для $C_{23}H_{14}C_{14}N_2O_5$ $[M + Na]^+$ 562.9522, найдено 562.9531.

Продукт **45** получили в виде белых кристаллов, выход 52% (100 мг). R_f 0.49 ($CHCl_3$: MeOH, 98 : 2). Тпл. 194.0–195.1°C. 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.81–1.77 (1H, дт, $J = 15.23$ Гц, $J = 3.98$ Гц, H_b-5'), 3.17–3.10 (1H, дт, $J = 15.37$ Гц, $J = 7.87$ Гц, H_a-5'), 5.75–5.72 (1H, м, H-4'), 5.79–5.77 (1H, д, $J = 8.16$ Гц, H-5), 5.89–5.86 (1H, м, H-1'), 6.06–6.04 (1H, дд, $J = 2.29$ Гц, $J = 5.57$ Гц, H-3'), 6.40–6.37 (1H, м, H-2'), 7.27–7.25 (1H, д, $J = 8.16$ Гц, H-6), 7.56 (1H, м, H-4''), 7.85–7.84 (2H, м, H-2'', H-6''), 9.08 (1H, с, NH). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 37.71, 58.54, 78.35, 103.27, 128.08, 132.58, 133.28, 134.67, 135.62, 136.16, 140.38, 150.88, 163.09, 163.62. HRESIMS m/z : рассчитано для $C_{16}H_{12}C_{12}N_2O_4$ $[M + H]^+$ 367.0247, найдено 367.0241; рассчитано для $C_{16}H_{12}C_{12}N_2O_4$ $[M + Na]^+$ 389.0066, найдено 389.0062.

1-(4'-Фенилацетокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (46) получали по методике описанной для **33** исходя из **41** и бензилбромида с выходом 35 % (10 мг в виде бесцветного масла). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.41–7.39 (2H, м, H2'', H6''), 7.25–7.18 (9H, м, H3'', H4'', H5'', 5Bn), 6.84–6.82 (1H, м, H6), 6.17–6.15 (1H, д, $J = 5.54$ Гц, H2'), 5.85–5.83 (1H, д, $J = 5.56$ Гц, H3'), 5.58–5.56 (3H, м, H1', H4', H5), 5.05–5.03 (2H, д, $J = 8.22$ Гц, CH_2), 3.55 (2H, с, CH_2), 2.87–2.83 (1H, м, H_a5'), 1.49 (1H, м, H_b5'). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 170.76 ($C''(O)$), 162.57, 151.62 (C-4, C-2), 138.33 (C-6), 135.96, 134.68 (C-2', C-3'), 133.71 (C-4''), 129.32 (C-1'', C-2'', C-6''), 128.82 (C-3'', C-5''), 128.48 (C-1, C-2, C-6 Bn), 127.73 (C-3, C-5 Bn), 127.44 (C-4 Bn), 102.57 (C-5), 76.78 (C-1'), 59.17 (C-4'), 44.59 (CH_2), 41.61 (CH_2 Bn), 37.24 (C-5').

1-(4'-Фенилэтоксид-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (47) получали по методике описанной для **33** исходя из **42** и бензилбромидом с выходом 60 % (25 мг в виде бесцветного масла). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.91-7.90 (2H, м, H2'', H6''), 7.30-7.23 (5H, м, Bn), 7.17- 7.14 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 7.02-7.00 (1H, м, H6), 6.19-6.18 (1H, д, $J = 5.54$ Гц, H2'), 5.89-5.88 (1H, д, $J = 5.53$ Гц, H3'), 5.75-5.73 (1H, д, $J = 8.02$ Гц, H5), 5.64-5.61 (2H, м, H1', H4'), 5.08-5.05 (2H, м, CH_2Bn), 2.94 (3H, м, $\text{CH}_2\beta$, H α 5'), 2.62 (2H, м, $\text{CH}_2\alpha$), 1.50-1.46 (1H, м, H β 5'). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 172.22 (C''(O)), 162.60, 151.61 (C-4, C-2), 140.17 (C-6), 138.42, (C-2'), 136.28 (C-4''), 136.28 (C-3'), 134.12 (C-1''), 129.23 (C-2'', C-6''), 128.60 (C-3'', C-5''), 128.35 (C-1, C-2, C-6 Bn), 127.73 (C-3, C-5 Bn), 126.50 (C-4 Bn), 102.53 (C-5), 76.78 (C-1'), 59.25 (C-4'), 44.59 (CH_2 Bn), 37.53 ($\text{CH}_2\beta$), 35.94 ($\text{CH}_2\alpha$), 31.07 (C-5').

1-(4'-(3-Цианобензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (48) получали аналогично, исходя из **43** и бензилбромидом, в виде белых кристаллов с выходом 79% (43 мг). R_f 0.69 (CHCl_3 : MeOH, 98 : 2). Тпл. 135.2–137.0°C. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.79–1.74 (1H, дт, $J = 15.18$ Гц, $J = 4.16$ Гц, H β -5'), 3.19–3.14 (1H, дт, $J = 15.32$ Гц, $J = 8.01$ Гц, H α -5'), 5.17, 5.07 (CH_a, CH_b , 2д, $J = 13.70$ Гц, CH_2Bn), 5.74–5.73 (1H, м, H-1'), 5.82–5.80 (1H, м, H-5), 5.90–5.88 (1H, м, H-4'), 6.05–6.03 (1H, дд, $J = 2.27$ Гц, $J = 5.58$ Гц, H-3'), 6.38–6.37 (1H, м, H-2'), 7.19–7.17 (1H, д, $J = 8.03$ Гц, H-6), 7.31–7.28 и 7.49–7.47 (5H, м, H-2''' и H-6'''), 7.60–7.57 (1H, м, H-5''), 7.86–7.83 (1H, м, H-6''), 8.21–8.20 (1H, м, H-4''), 8.28 (1H, с, H-2'') ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 37.97, 44.71, 59.45, 78.51, 102.87, 113.40, 117.83, 127.85, 128.58, 129.33, 129.77, 131.24, 133.44, 133.71, 134.92, 135.97, 136.46, 136.90, 138.23, 151.72, 162.59, 164.09. HRESIMS m/z : рассчитано для $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 414.1448, найдено 414.1460.

1-(4'-(3,5-Диметилбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (49) получали аналогично, исходя из **44** и бензилбромидом, в виде белых кристаллов с выходом 63% (26 мг, 0.06 ммоль). R_f 0.50 (CHCl_3 : MeOH, 98 : 2). Тпл. 118.3–120.0 °C. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.82–1.77 (1H, дт, $J = 15.36$ Гц, $J = 3.48$ Гц, H β -5'), 2.35 (6H, с, $2 \times \text{CH}_3$), 3.09–3.05 (1H, дт, $J = 15.61$ Гц, $J = 7.96$ Гц, H α -5'), 5.15, 5.12 (CH_a, CH_b , 2д, $J = 13.71$ Гц, CH_2Bn), 5.75–5.74 (1H, м, H-1'), 5.80–5.78 (1H, м, H-5), 5.87–5.85 (1H, м, H-4'), 6.00–5.98 (1H, дд, $J = 2.25$ Гц, $J = 5.54$ Гц, H-3'), 6.40–6.39 (1H, м, H-2'), 7.20 (1H, с, H-4''), 7.30–7.27 и 7.49–7.47 (6H, м, H-6, H-2''' и H-6'''), 7.59 (2H, с, H-2'', H-6''). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 21.45, 38.00, 44.71, 59.49, 77.51, 102.59, 127.44, 127.82, 128.01, 128.58, 128.82, 129.30, 129.77, 134.40, 135.17, 136.72, 136.86, 136.98, 138.41, 138.50, 138.70, 138.89, 151.76, 162.73, 166.28. HRESIMS m/z : рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 417.1809, найдено 417.1801; рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 439.1628, найдено 439.1626.

1-(4'-(3,5-Дихлорбензоилокси)-2'-циклопентен-1'-ил)-3-бензилурацил (50) получали аналогично, исходя из **45** и бензилбромид, в виде белых кристаллов с выходом 60% (45 мг). R_f 0.53 (CHCl_3 : MeOH , 98 : 2). Тпл. 94.1–96.0 °C. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.72–1.68 (1H, дт, $J = 15.24$ Гц, $J = 3.96$ Гц, H_b -5'), 3.09–3.01 (1H, дт, $J = 15.37$ Гц, $J = 7.88$ Гц, H_a -5'), 5.08, 5.05 (CH_a, CH_b , 2д, $J = 13.70$ Гц, CH_2Bn), 5.66–5.65 (1H, м, H-10), 5.68–5.67 (1H, м, H-5), 5.81–5.75 (1H, м, H-40), 5.98–5.96 (1H, дд, $J = 2.31$ Гц, $J = 5.58$ Гц, H-3'), 6.31–6.28 (1H, м, H-2'), 7.14–7.12 (1H, д, $J = 8.06$ Гц, H-6), 7.23–7.19 и 7.42–7.41 (5H, м, H-2''' и H-6'''), 7.49 (1H, с, H-4''), 7.78–7.77 (2H, м, H-2'', H-6''). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 37.79, 44.63, 59.33, 78.40, 102.76, 127.75, 128.07, 128.15, 128.33, 128.36, 128.42, 128.49, 129.24, 132.61, 133.24, 134.88, 135.60, 135.90, 136.83, 138.21, 151.63, 162.52, 163.62. HRESIMS m/z : рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 479.0536, найдено 479.0532.

(4'-Фенилацетокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3''',5'''-дифторбензил)урацил (51) получали аналогично соединению **33** исходя из **41** и 3,5-дифторбензилбромид с выходом 51 % (18 мг в виде светло-желтого масла). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.29-7.37 (5H, м, H2'', H6''), 6.94-6.92 (3H, м, H2''', H6''', H6), 6.71-6.68 (1H, м, H4'''), 6.25-6.24 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H2'), 5.93-5.92 (1H, д, $J = 5.45$ Гц, H3'), 5.65-5.63 (3H, м, H1', H4', H5), 5.05-5.04 (2H, д, $J = 3.00$ Гц, CH_2), 3.61 (2H, с, CH_2), 2.97-2.93 (1H, м, H_a 5'), 1.59-1.55 (1H, м, H_b 5'). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 170.71 ($\text{C}''(\text{O})$), 162.31, 151.48 (C-4, C-2), 138.70 (C-6), 136.17, 134.49 (C-2', C-3'), 133.69 (C-4''), 129.17 (C-1'', C-2'', C-6''), 128.81 (C-1''', C-2''', C-6'''), 127.44 (C-3'', C-5''), 111.95, 111.7 (C3''', C-5'''), 103.22 (C-4'''), 102.44 (C-5), 76.78 (C-1'), 59.30 (C-4'), 43.86 (CH_2), 41.59 (CH_2 '''), 37.21 (C-5').

1-(4'-Фенилпропаноилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(3''',5'''-дифторбензил)урацил (52) получали по методике описанной для соединения **45** исходя из **42** и 3,5-дифторбензилбромид с выходом 98 % (35 мг в виде бесцветного масла). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.19-7.17 (2H, м, H2'', H6''), 7.11-7.09 (3H, м, H3'', H4'', H5''), 7.00-6.98 (1H, д, $J = 8.06$ Гц, H6), 6.92-6.89 (2H, м, H2''', H6'''), 6.63 (1H, м, H4'''), 6.15-6.13 (1H, д, $J = 5.55$ Гц, H2'), 5.85-5.83 (1H, д, $J = 5.56$ Гц, H3'), 5.70-5.68 (1H, д, $J = 8.04$ Гц, H5), 5.57-5.55 (2H, м, H1', H4'), 5.01-4.99 (2H, м, CH_2 Bn), 2.89-2.85 (3H, м, $\text{CH}_{2\beta}$, H_a 5'), 2.56-2.54 (2H, м, $\text{CH}_{2\alpha}$), 1.45-1.41 (1H, м, H_b 5'). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 172.20 ($\text{C}''(\text{O})$), 162.34, 151.50 (C-4, C-2), 140.42 (C-4''), 138.79 (C-6), 136.53, (C-2'), 133.92 (C-3'), 128.61 (C-1'', C-2'', C-6''), 128.36 (C-1''', C-2''', C-6'''), 126.51 (C-3'', C-5''), 111.97 (C3'''), 111.72 (C-5'''), 103.24 (C-4'''), 102.44 (C-5), 76.82 (C-1'), 59.40 (C-4'), 43.87 (CH_2 Bn), 37.53 ($\text{CH}_{2\beta}$), 35.94 ($\text{CH}_{2\alpha}$), 31.07 (C-5').

Тестирование соединений **25-54**, описанных в данном разделе, в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1 было проведено В. Т. Валуевым-Эллистоном, ИМБ РАН, методика опубликована [143, 144, 235, 236, 241]. Компьютерное моделирование взаимодействия соединений **25-54** с обратной транскриптазой ВИЧ-1 было проведено Д. А. Бабковым, ВолгМУ, методика опубликована [143, 144, 235, 236, 241]. Ингибирующие свойства соединений в отношении *Trypanosoma brucei* исследовали в лаборатории проф. Г. де Конинга, Университет Глазго, Великобритания [242].

3.1.2.2. Синтез 5-ариламинопроизводных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-(фениламино)урацил (55) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(4'''-гидрокси-2'''-циклопентен-1'''-ил)-5-(фениламино)урацил (60). 5-Фениламиноурацил (200 мг, 0.7 ммоль), перемешивали в 50 мл сухого ДМФА при температуре 50°C до полного растворения. Далее добавляли раствор эпокси-циклопентена (63 мг, 0.77 ммоль) в свежеперегнанном ТГФ и Pd(PPh₃)₄ (40 мг, 0.035 ммоль). Оставляли перемешиваться на магнитной мешалке 4 часа при комнатной температуре. После чего упаривали в вакууме масляного насоса досуха, остаток растворяли в 5 мл смеси CHCl₃-MeOH (98:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Получили 98 мг (49 %) продукта **55** в виде светло-желтых кристаллов. При T = 214°C разлагается без плавления. ¹H-ЯМР (DMCO-d₆): 11.46 (1H, с, NH), 7.41 (1H, с, H₆), 7.12-7.08 (2H, м, H₂'', H₆''), 7.01 (1H, с, 5-NH), 6.80-6.78 (2H, м, H₃'', H₅''), 6.69-6.67 (1H, м, H₄''), 6.14-6.12 (1H, д, J = 5.52 Гц, H₂'), 5.85-5.83 (1H, д, J = 5.51 Гц, H₃'), 5.47-5.45 (1H, м, H₁'), 5.25 (1H, с OH), 4.64- 4.62 (1H, м, H₄'), 2.76-2.72 (1H, м, H_{a5}'), 1.46-1.43 (1H, м, H_{b5}'). ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆): 161.30, 149.63 (C-4, C-2), 145.48 (C-1'), 140, 130.97 (C-2', C-3'), 130.36 (C-6), 128.78 (C-3'', C5''), 118.10 (C-5), 116.99 (C-4''), 114.41 (C-2'', C-6''), 73.13 (C-1') 58.16 (C-4'), 40.91 (C-5'). MS (ES) m/z 285.978. Продукт **60** получали с выходом 39 % (100 мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.37 (1H, с, H₆), 7.24-7.21 (3H, м, H₂'', H₆''), 6.95-6.94 (2H, м, H₃'', H₅''), 6.93-6.91 (1H, м, NH), 6.90-6.86 (1H, м, H₄''), 6.20-6.19 (1H, д, J = 5.51 Гц, H₂'), 6.14-6.13 (1H, д, J = 5.50 Гц, H₂'''), 5.99-5.97 (2H, м, H₁'H₁'''), 5.82-5.81 (1H, д, J = 5.52 Гц, H₃'), 5.77-5.75 (1H, д, J = 5.49 Гц, H₃'''), 5.65-5.62 (1H, м, H₄'), 4.85- 4.83 (1H, м, H₄'''), 4.71 (1H, с, OH'), 4.24 (1H, с, OH'''), 2.92-2.82 (2H, м, H_{a5}'H_{a5}'''), 2.0-1.99 (1H, м, H_{b5}'), 1.96-1.94 (1H, м, H_{b5}'''). ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆): 160.83, 149.36 (C-4, C-2), 142.08 (C-1''), 139.42, 137.38 (C-2', C-2'''), 132.23, 130.76 (C-3', C-3'''), 129.54 (C-3'', C5''), 128.67 (C-4''), 121.20 (C-6),

118.76 (C-5), 117.20 (C-2'', C-6''), 76.31 (C-1'), 74.71 (C-1'''), 60.38 (C-4'), 56.94 (C-4'''), 39.89 (C-5'), 37.56 (C-5'''). MS (ES) m/z 367.0.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-(*n*-метилфениламино)урацил (56) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(4'''-гидрокси-2'''-циклопентен-1'''-ил)-5-(*n*-метилфениламино)урацил (61) получали и выделяли по методике описанной для соединения **55** исходя из 5-(*n*-метилфениламино)урацила (200 мг, 0.67 ммоль). Получили 82 мг продукта **56** в виде мелких светло-желтых кристаллов. Выход 41%. $T_{пл} = 212-213^{\circ}C$. 1H -ЯМР (ДМСО- d_6): 11.44 (1H, с, NH), 7.35 (1H, с, H6), 6.94-6.92 (2H, м, H3'', H5''), 6.85 (1H, с, 5-NH) 6.75-6.73 (2H, м, H2'', H6''), 6.13-6.11 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H2'), 5.83-5.81 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H3'), 5.47-5.44 (1H, м, H1'), 5.26 (1H, с OH), 4.63- 4.61 (1H, м, H4'), 2.75-2.67 (1H, м, H_a5'), 2.17 (3H, с, CH₃), 1.45-1.39 (1H, м, H_b5'). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6): 161.30, 149.63 (C-4, C-2), 145.48 (C-1''), 139.96, 131 (C-2', C-3'), 129.24 (C-3'', C5''), 127.67, 126.99 (C-6, C-5), 117.79 (C-4''), 115.02 (C-2'', C-6''), 73.13 (C-1') 58.12 (C-4'), 41.11 (C-5'), 20.07 (CH₃). MS (ES) m/z 299.99. Продукт **61** получали в виде масла с выходом 35 % (89%). 1H -ЯМР (CDCl₃): 7.27 (1H, с, H6), 7.05-7.03 (2H, м, H2'', H6''), 6.87-6.85 (2H, м, H3'', H5''), 6.19-6.17 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H2'), 6.14-6.13 (1H, д, $J = 5.51$ Гц, H2'''), 6.00-6.99 (1H, м, H1'), 5.97 (1H, м, H1'''), 5.82-5.81 (1H, д, $J = 5.50$ Гц, H3'), 5.77-5.75 (1H, д, $J = 5.51$ Гц, H3'''), 5.75-5.63 (1H, м, H4'), 4.85- 4.84 (1H, м, H4'''), 4.71 (1H, с, OH'), 4.27 (1H, с, OH'''), 2.82-2.76 (2H, м, H_a5', H_a5'''), 2.25 (3H, с, CH₃), 2.0-1.98 (1H, м, H_b5'), 1.65-1.63 (1H, м, H_b5''). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6): 160.78, 149.30 (C-4, C-2), 139.29 (C-1''), 137.33 (C-2', C-2'''), 132.28 (C-3', C-3'''), 130.79 (C-6), 130.05 (C-3'', C5''), 120.32 (C-4''), 117.87 (C-2'', C-6''), 117.24 (C-5), 76.31 (C-1'), 74.76 (C-1'''), 60.42 (C-4'), 56.90 (C-4'''), 39.90 (C-5'), 37.72 (C-5'''), 20.67 (CH₃). MS (ES) m/z 381.045.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-(*n*-бутилфениламино)урацил (57) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(4'''-гидрокси-2'''-циклопентен-1'''-ил)-5-(*n*-бутилфениламино)урацил (62) получали и выделяли по методике описанной для соединения **55** исходя из 5-(*n*-бутилфениламино)урацила. Выход продукта **57** в виде бесцветного масла составил 17% (42 мг). $E(\lambda_{261.4}) = 22\ 400$. 1H -ЯМР (ДМСО- d_6): 11.45 (1H, с, NH), 7.37 (1H, с, H-6), 6.95–6.93 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.87 (1H, с, 5-NH), 6.76–6.74 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.14–6.12 (1H, м, H-2'), 5.84–5.83 (1H, м, H-3'), 5.48–5.45 (1H, м, H-1'), 5.27 (1H, с, OH), 4.63–4.62 (1H, м, H-4'), 2.74–2.70 (1H, м, H_a-5'), 2.46–2.42 (2H, м, CH₂), 1.49–1.47 (3H, м, H_b-5', CH₂), 1.31–1.29 (2H, м, CH₂), 0.90–0.88 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6): 161.22, 149.46 (C-4, C-2), 142.82 (C-4''), 139.96 (C-2'), 132.08 (C-1''), 130.97 (C-3'), 128.55 (C-3'', C5''), 128.28 (C-6), 117.61 (C-5), 114.74 (C-2'', C-6''), 73.14 (C-1'), 58.11 (C-4'), 39.09 (C-5'), 33.93 (CH₂), 33.33 (CH₂), 21.62 (CH₂), 13.70 (CH₃). HRMS: найдено m/z 342.1805;

вычислено $C_{19}H_{23}N_3O_3$ $[M + H]^+$ 342.1812; найдено m/z 364.1629; вычислено $C_{19}H_{23}N_3O_3$ $[M + Na]^+$ 364.1632. Элементный анализ: вычислено $C_{19}H_{23}N_3O_3$: C, 66.84; H, 6.79; N, 12.31; найдено: C, 66.74; H, 6.78; N, 12.34. Продукт **62** получали в виде желтого масла с выходом 31% (96 мг, 0.22 ммоль). $E(\lambda_{336.2}) = 8300$. 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.98 (1H, с, 5-NH), 7.29 (1H, м, H-6), 7.06–7.04 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.89–6.87 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.20–6.18 (1H, м, H-2'), 6.15–6.14 (1H, м, H-2'''), 6.00–5.97 (1H, д, H-3'), 5.94 (1H, м, H-1'), 5.82–5.81 (1H, м, H-3'''), 5.77–5.76 (1H, м, H-1'''), 5.64–5.62 (1H, м, H-4'), 4.85–4.84 (1H, м, H-4''), 4.72 (1H, с, OH'), 4.25 (1H, с, OH'''), 2.85–2.80 (2H, м, Ha-5', Ha-5'''), 2.54–2.50 (2H, м, CH₂), 2.01–1.97 (1H, м, Hb-5'), 1.68–1.67 (1H, м, Hb-5'''), 1.55–1.53 (2H, м, CH₂), 1.32–1.30 (2H, м, CH₂), 0.92–0.91 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 160.89, 149.89 (C-4, C-2), 139.43, 137.46 (C-2', C-2'''), 136.13 (C-4''), 134.0 (C-1''), 132.34, 130.86 (C-3', C-3'''), 129.50 (C-3'', C5''), 128.68 (C-6), 120.30 (C-5), 117.70, 117.56 (C-2'', C-6''), 76.41 (C-1'), 74.86 (C-1'''), 60.53 (C-4'), 57.0 (C-4''), 40.0 (C-5'), 37.68 (C-5'''), 36.61 (CH₂), 35.0 (CH₂), 22.48 (CH₂), 14.09 (CH₃). HRMS: найдено m/z 423.2141; вычислено $C_{24}H_{29}N_3O_4$ $[M]^+$ 423.2153; найдено m/z 446.2040; вычислено $C_{24}H_{29}N_3O_4$ $[M + Na]^+$ 446.2050. Элементный анализ: вычислено $C_{24}H_{29}N_3O_4$: C, 68.06; H, 6.90; N, 9.92; найдено: C, 68.15; H, 6.83; N, 9.93.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-(*n*-бутилоксифениламино)урацил (58) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(4'''-гидрокси-2'''-циклопентен-1'''-ил)-5-(*n*-бутилоксифениламино)урацил (63) получали и выделяли по методике описанной для соединения **55** исходя из 5-(*n*-бутилоксифениламино)урацила. Выход продукта **58** в виде желтого масла составил 22% (54 мг). $E(\lambda_{262.2}) = 21\ 100$. 1H -ЯМР ($DMCO-d_6$): 11.44 (1H, с, NH), 7.28 (1H, с, H-6), 6.84–6.82 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.75–6.72 (3H, м, 5-NH, H-3'', H-5''), 6.13–6.11 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H-2'), 5.83–5.80 (1H, д, $J = 5.51$ Гц, H-3'), 5.48–5.44 (1H, м, H-1'), 5.26 (1H, с, OH), 4.63–4.61 (1H, м, H-4'), 3.88–3.85 (2H, м, CH₂), 2.74–2.66 (1H, м, Ha-5'), 1.65–1.63 (2H, м, CH₂), 1.44–1.41 (3H, м, CH₂, Hb-5'), 0.94–0.90 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР ($DMCO-d_6$): 161.10, 151.97 (C-4, C-2), 149.29 (C-4''), 139.92 (C-2'), 137.87 (C-1''), 131.05 (C-3'), 124.99 (C-6), 116.96 (C-3'', C5''), 115.06 (C-2'', C-6''), 73.13, 73.03 (C-1', C-4'), 67.43 (C-5), 58.11 (C-5'), 39.12 (CH₂), 30.87 (CH₂), 18.71 (CH₂), 13.65 (CH₃). HRMS: найдено m/z 380.1570; вычислено $C_{19}H_{23}N_3O_4$ $[M + Na]^+$ 380.1581. Элементный анализ: вычислено $C_{19}H_{23}N_3O_4$: C, 63.85; H, 6.49; N, 11.76; найдено: C, 63.84; H, 6.58; N, 11.77. Продукт **63** получали в виде желтого масла с выходом 38% (115 мг). $E(\lambda_{262.4}) = 11\ 300$. 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.98 (1H, с, 5-NH), 7.12 (1H, м, H-6), 6.93–6.91 (2H, м, H-3'', H-5''), 6.82–6.79 (2H, м, H-2'', H-6''), 6.16–6.13 (2H, м, H-2', H-2'''), 6.00–5.98 (1H, д, H-3'), 5.80–5.77 (3H, м, H-3'', H-1', H-1'''), 5.60–5.57 (1H, м, H-4'), 4.83–4.81 (1H, м, H-4''), 4.71 (1H, с, OH'), 4.30 (1H, с, OH'''), 3.92–3.90 (2H, м, CH₂), 2.80–2.79 (2H, м, Ha-5', Ha-5'''), 2.0–1.97 (1H, м, Hb-5'), 1.65–

1.64 (2H, м, CH₂), 1.63–1.61 (1H, м, H_b-5'''), 1.47–1.46 (2H, м, CH₂), 0.97–0.94 (3H, м, CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 160.80, 154.71 (C-4, C-2), 149.35 (C-4''), 139.32 (C-1''), 137.44 (C-20, C-2'''), 134.81 (C-6), 132.33, 130.88 (C-3', C-3'''), 121.60 (C-5), 120.64 (C-3'', C5''), 115.80, 115.70 (C-2'', C-6''), 76.41 (C-1'), 74.85 (C-1'''), 68.32 (C-4'), 60.57 (C-4'''), 56.95 (C-5'), 39.96 (C-5'''), 37.67 (CH₂), 31.57 (CH₂), 19.41 (CH₂), 14.00 (CH₃). HRMS: найдено *m/z* 462.1991; вычислено C₂₄H₂₉N₃O₅ [M + Na]⁺ 462.1999. Элементный анализ: вычислено C₂₄H₂₉N₃O₅: C, 65.59; H, 6.65; N, 9.56; найдено: C, 65.55; H, 6.63; N, 9.59.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-(4''-феноксифениламино)урацил (59) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3-(4'''-гидрокси-2'''-циклопентен-1'''-ил)-5-(4''-феноксифениламино)урацил (64) получали и выделяли по методике описанной для **55** исходя из 5-(4''-феноксифениламино)урацила (200 мг, 0.53 ммоль). Выход продукта **59** составил 35% (70 мг). При T = 200°C разлагается без плавления. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 11.45 (1H, с, NH), 7.40 (1H, с, H₆), 7.32-7.30 (2H, м, H₃Ph, H₅Ph), 7.04 (2H, м, H₃', H₅'), 6.89-6.88 (2H, м, 5-NH, H₆'), 6.84 (3H, с, H₂Ph, H₄Ph, H₆Ph), 6.14-6.13 (1H, д, *J* = 5.50 Гц, H₂'), 5.84-5.83 (1H, д, *J* = 5.51 Гц, H₃'), 5.48-5.46 (1H, м, H₁'), 5.28-5.27 (1H, м, H₄') 4.63-4.62 (1H, с OH), 2.71-2.67 (1H, м, H_a5'), 1.44-1.41 (1H, м, H_b5'). ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 161.24 (C-4), 158.24 (C-1Ph), 149.57 (C-2), 147.73 (C-1''), 141.85, 139.97 (C-2', C-3'), 131.01 (C-6), 129.71 (C-3Ph, C-5Ph), 129.51 (C-5), 122.17 (C-4Ph), 120.34 (C-2Ph, C₆Ph), 117.46 (C-4''), 117.46 (C-3'', C5''), 115.88 (C-2'', C-6''), 73.15 (C-1'), 58.17 (C-4'), 41.21 (C-5'). MS (ES) *m/z* 377.046. Продукт **64** получали в виде масла с выходом 40% (97 мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.29 (2H, м, H₃Ph, H₅Ph), 7.24 (1H, с, H₆), 7.04-7.02 (1H, м, H₄Ph), 6.93 (6H, м, H₂Ph, H₆Ph, H₂'', H₃'', H₅'', H₆''), 6.19-6.18 (1H, д, *J* = 5.52 Гц, H₂'), 6.14-6.13 (1H, д, *J* = 5.51 Гц, H₂'''), 6.00 (1H, м, H₁'), 5.98 (1H, м, H₁'''), 5.83-5.81 (1H, д, *J* = 5.50 Гц, H₃'), 5.77-5.76 (1H, д, *J* = 5.51 Гц, H₃'''), 5.65-5.62 (1H, м, H₄'), 4.84-4.83 (1H, м, H₄'''), 4.73 (1H, с, OH'), 4.28 (1H, с, OH'''), 2.83-2.79 (2H, м, H_a5', H_a5'''), 2.01-1.97 (1H, м, H_b5'), 1.67-1.63 (1H, м, H_b5'''). ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆): 160.78 (C-4), 158.09 (C-1Ph), 151.26 (C-2), 149.32 (C-4''), 139.33 (C-2'), 137.80 (C-1''), 137.41 (C-2'''), 132.31 (C-3'), 130.67 (C-3'''), 129.74 (C-3Ph, C-5Ph), 122.84 (C-6), 120.61 (C-2Ph, C₆Ph), 120.34 (C-4Ph), 119.11 (C-3'', C5''), 118.12 (C-2'', C-6''), 117.24 (C-5), 76.32 (C-1'), 74.72 (C-1'''), 60.42 (C-4'), 56.95 (C-4'''), 39.79 (C-5'), 37.58 (C-5'''). MS (ES) *m/z* 459.050.

Тестирование соединений **55-64**, описанных в данном разделе, в качестве ингибиторов ОТ ВИЧ-1 было проведено В. Т. Валуевым-Эллистоном, ИМБ РАН, методика опубликована [241, 247]. Противотуберкулезная активность соединений, описанных в данном разделе, в отношении лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и штамма

M.tuberculosis MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью, резистентного к действию препаратов первого ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и пиразинамид), была изучена в Центральном научно-исследовательском институте туберкулёза РАМН, методика опубликована [247, 250].

3.1.2.3. Синтез производных 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)урацила, замещенных по 5 положению.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил (65) синтезировали в соответствии с общей методикой получения 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов (см. 3.1. Общие методы к разделу 2.1.), в качестве основания использовали 5-йодурацил. Получили 325 мг продукта **65** в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 24%. $T_{пл} = 189.5-190.5^{\circ}\text{C}$. УФ (MeOH λ_{max} , нм): 291.1 (ϵ 9050). ^1H -ЯМР (DMCO- d_6): 11.60 (1H, с, NH), 7.84 (1H, с, H6), 6.17-6.16 (1H, д, $J = 5.20$ Гц, H2'), 5.38-5.36 (1H, д, $J = 5.40$ Гц, H3'), 5.35-5.34 (1H, м, H1'), 5.25 (1H, с OH), 5.28-5.26 (1H, м, H4'), 2.68-2.66 (1H, м, H_a5'), 1.43-1.39 (1H, м, H_a5'). ^{13}C -ЯМР (DMCO- d_6): 160.48, 150.49 (C-4, C-2), 146.12 (C-6), 140.38, 130.69 (C-2', C-3'), 73.24 (C-5), 68.99 (C-1'), 58.59 (C-4'), 38.8 (C-5'). HRESIMS: найдено m/z 320.9728, рассчитано для $\text{C}_9\text{H}_9\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320.9731; m/z 342.9545; рассчитано для $\text{C}_9\text{H}_9\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 342.9550.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-децинилурацил (66). К раствору **65** (100 мг, 0.3 ммоль) в 15 мл свежеперегнанного ДМФА, добавляли CuI (30 мг, 0.15 ммоль), этилдиизопропиламин (200 мкл, 1.2 ммоль), Pd(PPh₃)₄ (52 мг, 0.045 ммоль) и 1-децин (110 мкл, 0.6 ммоль), в атмосфере аргона. Реакционную массу перемешивали в течение 2 часов, после чего добавляли 0.5 М раствор ЭДТА и концентрировали в вакууме масляного насоса. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле последовательно в двух системах: 1) элюент CHCl₃-MeOH (98:2); 2) элюент EtOAc-MeOH (9:1), получили 32 мг продукта **66** в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 32%. $T_{пл} = 135.5-137^{\circ}\text{C}$. УФ (MeOH λ_{max} , нм): 297.1 (ϵ 10200). ^1H -ЯМР (CD₃OD): 7.70 (1H, с, H6), 6.24-6.23 (1H, д, $J = 5.55$ Гц, H2'), 5.87-5.85 (1H, д, $J = 5.56$ Гц, H3'), 5.54-5.50 (1H, м, H1'), 4.50 (1H, м, H4'), 2.89-2.86 (1H, м, H_a5'), 2.37 (2H, м, CH₂ α), 1.55-1.52 (3H, м, CH₂ β , H_b5'), 1.50-1.48 (2H, м, CH₂ γ), 1.45-1.42 (8H, с, (CH₂)₄), 1.35-1.33 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (CD₃OD): 164.76, 150.05 (C-4, C-2), 145.20, 141.18 (C-2', C-3'), 132.09 (C-6), 101.66 ($\equiv\text{C}$), 95.47 (C-5), 75.35 (C-1'), 72.39 (C \equiv), 60.72 (C-4'), 41.25 (C α), 32.99 (C β), 29.73 (C-5', 4 C), 23.68 (C γ), 14.40 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 331.2023, рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 331.2016; найдено m/z 353.1839; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 353.1836.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-додецинилурацил (67) синтезировали аналогично соединению **66** исходя из **65** и 1-додецина. Получили 47 мг целевого продукта в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 28%. $T_{пл} = 138-139.5^{\circ}\text{C}$. УФ (MeOH λ_{max} , нм): 297.6 (ϵ 10400). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): 11.52 (1H, с, NH), 7.66 (1H, с, H6), 6.22-6.20 (1H, д, $J = 5.51$ Гц, H2'), 5.38-5.36 (1H, д, $J = 5.52$ Гц, H3'), 5.43-5.42 (1H, м, H1'), 5.32-5.31 (1H, с OH), 4.67 (1H, м, H4'), 2.77-2.75 (1H, м, H_a5'), 2.41-2.39 (2H, м, CH_{2a}), 1.53-1.49 (2H, м, CH_{2b}), 1.45-1.43 (1H, м, H_b5'), 1.41-1.39 (2H, м, CH_{2γ}), 1.30 (12H, с, (CH₂)₆), 0.92-0.89 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6): 161.99, 150.05 (C-4, C-2), 144.02 (C-6), 140.51, 130.79 (C-2', C-3'), 99.28 (C-5), 93.67 ($\equiv\text{C}$), 73.47 (C-1'), 72.82 (C \equiv), 58.76 (C-4'), 39.50 (C-5', 6 C), 31.41 (C α), 22.21 (C β), 18.89 (C γ), 14.06 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 359.2310, рассчитано для C₂₁H₃₀N₂O₃ [M+H]⁺ 359.2317; найдено m/z 381.2134; рассчитано для C₂₁H₃₀N₂O₃ [M+Na]⁺ 381.2149.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадецинилурацил (68) синтезировали аналогично соединению **66** исходя из **65** и 1-тетрадецина. Получили 43 мг целевого продукта в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 24%. $T_{пл} = 143-144^{\circ}\text{C}$. УФ (MeOH λ_{max} , нм): 296.9 (ϵ 9900). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): 11.46 (1H, с, NH), 7.60 (1H, с, H6), 6.16-6.14-6.20 (1H, д, $J = 5.49$ Гц, H2'), 5.81-5.80 (1H, д, $J = 5.51$ Гц, H3'), 5.39-5.37 (1H, м, H1'), 5.25-5.24 (1H, с OH), 4.61 (1H, м, H4'), 2.75-2.69 (1H, м, H_a5'), 2.36-2.32 (2H, м, CH_{2a}), 1.49-1.45 (2H, м, CH_{2b}), 1.43-1.39 (1H, м, H_b5'), 1.24 (18H, с, (CH₂)₉), 0.87-0.83 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6): 161.79, 151.13 (C-4, C-2), 146.01 (C-6), 141.49, 132.13 (C-2', C-3'), 99.34 (C-5), 93.45 ($\equiv\text{C}$), 73.77 (C-1'), 71.54 (C \equiv), 58.55 (C-4'), 39.37 (C-5', 8C), 31.41 (C α), 22.21 (C β), 18.85 (C γ), 13.96 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 387.2620, рассчитано для C₂₃H₃₄N₂O₃ [M+H]⁺ 387.2642; найдено m/z 409.2438; рассчитано для C₂₃H₃₄N₂O₃ [M+Na]⁺ 409.2462.

(-)-1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен)-5-йодурацил (-)-65 и **1-(4'-ацетилокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил (+)-90**. К раствору (\pm)**65** (100мг, 0.31 ммоль) в 20 мл винилацетата добавляли липазу (Amano PS lipase) (100 мг). Реакционную массу интенсивно перемешивали в течение 24 часов. После раствор концентрировали в вакууме водоструйного насоса и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃. Получали 48 мг (49%) продукта **(-)-65**. $T_{пл} = 189.5-190.5^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_D^{25} -66.4$ (с 0.035, CHCl₃) КД = -10.92 моль⁻¹*см⁻¹) и 54 мг продукта **(+)-90** (Выход 51%). ^1H -ЯМР (CDCl₃): 8.71 (1H, с, NH), 7.60 (1H, с, H6), 6.29-6.27 (1H, м, H2'), 5.93-5.91 (1H, м, H3'), 5.60-5.58 (2H, м, H1', H4'), 2.90-2.81 (1H, м, H_a5'), 2.05 (1H, с, CH₃), 1.65-1.63 (1H, м, H_a5'). HRESIMS: найдено m/z 362.9832, рассчитано для C₁₁H₁₁IN₂O₄ [M+H]⁺ 362.9836; найдено m/z 384.9661; рассчитано для C₁₁H₁₁IN₂O₄ [M+Na]⁺ 384.9656).

(+)-1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-йодурацил (+)-65. Соединение **(+)-90** (163 мг, 0.45 ммоль) растворяли в MeOH (10 мл), добавляли свежeproкаленный K₂CO₃ (155 мг, 1.13 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре на 18 часов. Растворители удаляли в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяли в 3 мл смеси CHCl₃-MeOH (98:2) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃-MeOH (98:2). Получили 108 мг продукта **(+)-65** в виде мелких бесцветных кристаллов. Выход 75%. T_{пл} = 190-190.5°C. $[\alpha]_D^{25} + 65.7$ (с 0.04, CHCl₃) КД = 10.89 моль⁻¹*см⁻¹.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадецинилурацил (+)-68 получали как описано для **(+)-68** исходя из **(+)-65** с выходом 46% (25 мг). $[\alpha]_D^{25} + 42.9^\circ$ (с 0.05, CHCl₃) КД = 2.68 моль⁻¹*см⁻¹.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-5-тетрадецинилурацил (-)-68 получали как описано для **(±)-68** исходя из **(-)-65** с выходом 49% (30 мг). $[\alpha]_D^{25} - 77.7^\circ$ (с 0.038, CHCl₃) КД = -2.61 моль⁻¹*см⁻¹.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3,5-дидецинилурацил (69) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-октинил-3H-фурано[2,3-d]-пиримидин-2-он (72) получали в качестве побочных продуктов в процессе синтеза соединения **66**. Продукт **69** выделяли в виде бесцветного масла с выходом 16% (22 мг). УФ (MeOH λ_{max}, нм): 342.2 (ε 6200). ¹H ЯМР (CDCl₃): 7.94 (1H, с, H6), 6.31–6.29 (1H, м, H2'), 5.9–5.88 (1H, м, H3'), 5.75–5.72 (1H, м, H1'), 4.93–4.91 (1H, м, H4'), 3.05–3.01 (1H, м, H_a5'), 2.71–2.69 (2H, м, N-CH_{2α}), 2.40–2.38 (2H, м, C-CH_{2α}), 1.7–1.68 (2H, м, N-CH_{2β}), 1.58–1.56 (2H, м, C-CH_{2β}), 1.42 (1H, м, H_b5'), 1.51–1.18 (20H, м, 2×(CH₂)₅), 0.88 (6H, м, 2-CH₃). HRESIMS: найдено *m/z* 467.3308, рассчитано для C₂₉H₄₂N₂O₃ [M+H]⁺ 467.3315; найдено *m/z* 489.3178; рассчитано для C₂₉H₄₂N₂O₃ [M+Na]⁺ 489.3193. Продукт **72** получали в виде светло-желтых кристаллов с выходом 13% (13 мг). T_{пл} = 164-165.5°C. УФ (MeOH λ_{max}, нм): 335.6 (ε 5000), 246.1 (ε 8400). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.99 (1H, с, H6), 6.29-6.28 (1H, д, *J* = 5.37 Гц, H2'), 6.06 (1H, с H9), 5.89-5.87 (1H, д, *J* = 5.46 Гц, H3'), 5.83-5.81 (1H, м, H1'), 4.93-4.92 (1H, м, H4'), 3.01-2.97 (1H, м, H_a5'), 2.63-2.59 (2H, м, CH_{2α}), 1.65 (1H, м, H_b5'), 1.60-1.58 (2H, м, CH_{2β}), 1.25 (10H, с, (CH₂)₅), 0.86 (3H, м, CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 171.74 (C-9), 160.34, 155.78 (C-4, C-2), 139.81 (C-6), 136.97, 132.32 (C-2', C-3'), 108.58 (C-8), 98.81 (C-5), 75.13 (C-5'), 62.60 (C-1'), 41.21 (C-4'), 31.95 (Cα), 29.35 (Cβ), 29.29, 29.18, 28.44, 26.96, 22.77 (5C), 14.20 (CH₃). HRESIMS: найдено *m/z* 331.2010, рассчитано для C₁₉H₂₆N₂O₃ [M+H]⁺ 331.2016; найдено *m/z* 353.1825; рассчитано для C₁₉H₂₆N₂O₃ [M+Na]⁺ 353.1836.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-3,5-дидодецинилурацил (70) и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-децинил-3H-фурано[2,3-d]-пиримидин-2-он (73) получали в

качестве побочных продуктов в процессе синтеза соединения **67**. Продукт **70** выделяли в виде бесцветного масла с выходом 17 % (27 мг). УФ (MeOH λ_{\max} , нм): 342 (ε 6500). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.91–7.89 (1H, с, H6), 6.4–6.37 (1H, м, H2'), 6.0–5.98 (1H, м, H3'), 5.79–5.77 (1H, м, H1'), 4.91–4.87 (1H, м, H4'), 3.21–3.18 (1H, м, H_a5'), 2.83–2.78 (2H, м, N-CH_{2α}), 2.45–2.4 (2H, м, C-CH_{2α}), 1.76–1.74 (2H, м, N-CH_{2β}), 1.61–1.57 (2H, м, C-CH_{2β}), 1.48–1.46 (1H, м, H_b5'), 1.44–1.23 (28H, м, 2-(CH₂)₇), 0.84 (6H, м, 2-CH₃). HRESIMS: найдено m/z 523.3904, рассчитано для C₃₃H₅₀N₂O₃ [M+H]⁺ 523.3911; найдено m/z 545.3717; рассчитано для C₃₃H₅₀N₂O₃ [M+Na]⁺ 545.3721. Продукт **73** получали в виде светло-желтых кристаллов с выходом 15% (16 мг). T_{пл} = 166–168°C. УФ (MeOH λ_{\max} , нм): 335.9 (ε 5400), 245.6 (ε 9000). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.96 (1H, с, H6), 6.24–6.22 (1H, д, J = 5.47 Гц, H2'), 6.01 (1 H, с, H9), 5.82–5.80 (1H, д, J = 5.43 Гц, H3'), 5.77–5.75 (1H, м, H1'), 4.87–4.86 (1H, м, H4'), 2.97–2.95 (1H, м, H_a5'), 2.57–2.53 (2H, м, CH_{2α}), 1.61 (1H, м, H_b5'), 1.59–1.57 (2H, м, CH_{2β}), 1.19 (14H, с, (CH₂)₇), 0.82–0.79 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 171.63 (C-9), 160.24, 155.74 (C-4, C-2), 139.83 (C-6), 137.01, 132.13 (C-2', C-3'), 108.52 (C-8), 98.77 (C-5), 74.96 (C-5'), 62.48 (C-1'), 41.13 (C-4'), 31.94 (Cα), 29.61 (Cβ), 29.55, 29.34, 29.31, 29.10, 28.35, 26.88, 22.72 (7C), 14.14 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 359.2323, рассчитано для C₂₁H₃₀N₂O₃ [M+H]⁺ 359.2329; найдено m/z 381.2143; рассчитано для C₂₁H₃₀N₂O₃ [M+Na]⁺ 381.2149.

1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен)-3,5-дитетрадецилилурацил (71) и **1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-6-додецинил-3H-фурано[2,3-d]-пиримидин-2-он (74)** получали в качестве побочных продуктов в процессе синтеза соединения **51**. Продукт **54** выделяли в виде бесцветного масла с выходом 17% (29 мг). УФ (MeOH λ_{\max} , нм): 342.2 (ε 6300). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.87 (1H, с, H6), 6.25–6.23 (1H, м, H2'), 5.84–5.82 (1H, м, H3'), 5.69–5.66 (1H, м, H1'), 4.87–4.85 (1H, м, H4'), 3.02–2.94 (1H, м, H_a5'), 2.67–2.63 (2H, м, N-CH_{2α}), 2.37–2.33 (2H, м, C-CH_{2α}), 1.65–1.63 (2H, м, N-CH_{2β}), 1.55–1.54 (2H, м, C-CH_{2β}), 1.54–1.53 (1H, м, H_b5'), 1.51–1.18 (36H, м, 2×(CH₂)₉), 0.81 (6H, м, 2-CH₃). HRESIMS: найдено m/z 579.4509, рассчитано для C₃₇H₅₈N₂O₃ [M+H]⁺ 579.4520; найдено m/z 601.4332; рассчитано для C₃₇H₅₇N₂O₃ [M+Na]⁺ 601.4340. Продукт **74** получали в виде мелких желтых кристаллов с выходом 15% (17 мг). T_{пл} = 156.5–158.5°C. УФ (MeOH λ_{\max} , нм): 335.4 (ε 4900), 245.7 (ε 8900). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 7.92 (1H, с, H6), 6.23–6.22 (1H, м, J = 5.38 Гц, H2'), 6.0 (1 H, с, H9), 5.83–5.82 (1H, д, J = 5.40 Гц, H3'), 5.77–5.75 (1H, м, H1'), 4.87–4.86 (1H, м, H4'), 2.98–2.96 (1H, м, H_a5'), 2.55–2.54 (2H, м, CH_{2α}), 1.61 (1H, м, H_b5'), 1.60–1.58 (2H, м, CH_{2β}), 1.18 (18H, с, (CH₂)₉), 0.80 (3H, м, CH₃). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 172.03 (C-9), 161.10, 156.12 (C-4, C-2), 140.29 (C-6), 135.08, 132.25 (C-2', C-3'), 108.64 (C-8), 98.69 (C-5), 74.92 (C-5'), 63.50 (C-1'), 42.35 (C-4'), 32.65 (Cα), 30.50 (Cβ), 29.43, 29.27, 29.12, 28.97, 28.78, 28.35, 26.68, 25.54,

22.17 (9 C), 14.21 (CH₃). HRESIMS: найдено m/z 387.2637, рассчитано для C₂₃H₃₄N₂O₃ [M+H]⁺ 387.2642; найдено m/z 409.2458; рассчитано для C₂₃H₃₄N₂O₃ [M+Na]⁺ 409.2462.

(±)-1-(4'-Гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)-тимин (88) синтезировали в соответствии с общей методикой получения 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов (см. 3.1. Общие методы к разделу 2.1.), в качестве основания использовали тимин (1 г, 8.0 ммоль). Соединение **(±)-88** получали в виде белых кристаллов (600 мг, 36%): R_f 0.32 (95: 5 CHCl₃: MeOH). ¹H-ЯМР (DMCO-d₆): 11.20 (1H, уш. с, NH), 7.28 (1H, с, H-6), 6.14-6.11 (1H, м, H-2'), 5.79-5.77 (1H, м, H-3'), 5.39-5.36 (1H, м, H-1'), 5.20 (1H, д, J = 6.0 Гц, OH), 4.63-4.61 (1H, м, H-4'), 2.74-2.70 (1H, м, H-a5'), 1.76 (3H, с, 5-CH₃), 1.37-1.33 (1H, м, H-b5').

(±)-1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацил (87). К раствору **(±)-88** (0.6 г, 3 ммоль) в безводном MeOH (15 мл) добавляли 0.1 г 10% Pd/C и реакционную смесь гидрировали в атмосфере H₂, перемешивая при комнатной температуре в течение 18 часов. Смесь фильтровали через целит, и фильтрат упаривали досуха. Остаток растворяли в смеси 98:2 CHCl₃:MeOH (5 мл) и делили колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя той же системой растворителей, а затем смесью 95:5 CHCl₃: MeOH, получая **(±)-1-(4'-гидроксициклопент-1'-ил)-тимин** в виде серовато-белого порошкообразного вещества (510 мг, 81%): R_f 0,35 (95:5 CHCl₃: MeOH). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.77 (1H, уш. с, NH), 7.48 (1H, с, H-6), 5.03-4.95 (1H, м, H-1'), 4.41 (1H, м, H-4'), 2.39 (1H, д, J = 8.0 Гц, OH), 2.36-2.30 (1H, м, H-a5'), 2.20-2.13, 2.00-1.98 и 1.73-1.71 (4H, 3m, H-2' и H-3'), 1.70-1.67 (1H, м, H-b5').

К раствору **(±)-1-(4'-гидроксициклопент-1'-ил)-тимина** (0.5 г, 2.4 ммоль) в безводном пиридине (15 мл) добавляли Ac₂O (0.275 мл, 2.9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, концентрировали в вакууме и остаток, растворенный в CHCl₃ (5 мл) делили колоночной хроматографией на силикагеле. Элюирование CHCl₃ с последующим 98:2 CHCl₃:MeOH дает **(±)-1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-тимин** в виде белого порошкообразного вещества (0.5 г, 83%): R_f 0.36 (элюирование 98:2 CHCl₃:MeOH). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9,13 (1H, уш. С, NH), 7,21 (1H, с, H-6), 5,23-5,20 (1H, м, H-1'), 5,14-5,10 (1H, м, H-4'), 2,54-2,47 (1H, м, H-a5'), 2,20-2,16, 2,00-1,98 и 1,87-1,82 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2,08 (3H, с, Ac), 1,78-1,73 (1H, м, H-b5').

Раствор Br₂ (0.2 мл, 2.4 ммоль) в дихлорэтано (5 мл) добавляли по каплям в течение 3 часов при перемешивании к кипящему раствору **(±)-1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-тимина** (0.25 г, 1 ммоль) в дихлорэтано (10 мл) при постоянном облучении лампой накаливания 300 Вт в атмосфере аргона. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в

EtOAc / гексане (1:1). Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с толуолом (3 × 10 мл), полученный (\pm)-**87** растворяли в ДМФ (5 мл) и использовали без дополнительной очистки в последующих реакциях.

Общая методика синтеза (\pm)-1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-алкилоксиметилурацилов (75-77). Соответствующий спирт (1,5 ммоль) добавляли к раствору 1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацила (**87**) (0,5 ммоль) в сухом ДМФ (10 мл). Смесь перемешивали в течение 48 часов при 37°C в атмосфере аргона, упаривали в вакууме и остаток растворяли в CHCl₃ (5 мл) и делили методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюировали смесью CHCl₃: MeOH (98: 2), получая фракции, обогащенные целевыми продуктами, которые были сконцентрированы и очищены, как описано ниже.

(\pm)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-децилоксиметилурацил (75). Продукт (\pm)-**75** выделяли с помощью PLC, элюируя смесью EtOAc/гексан (2:1), и получали в виде белого порошка (92 мг, 45%): R_f 0,40 (98:2 CHCl₃:MeOH). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.76 (1H, уш. с, NH), 7.49 (1H, с, H-6), 5.23-5.21 (1H, м, H-1'), 5.15-5.11 (1H, м, H-4'), 4.26 (2H, с, 5-CH₂O), 3.51 (2H, t, J = 8 Гц, CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 2.55-2.47 (1H, м, H- a5'), 2.20-2.16, 2.01-1.99 и 1.87-1.83 (4H, 3m, H-2' и H-3'), 2,08 (3H, с, Ac), 1,78-1,72 (1H, м, H-b5'), 1.61-1.57 (2H, м, CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 1.29-1.25 (14H, м, CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 0.86 (3H, т, J = 8 Гц, CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.3 (C(O) Ac), 162.2, 151.0 (C-4, C-2), 138.0 (C-6), 112.9 (C-5), 74.8 (C-4'), 71.6 (5-CH₂O), 65.0 (CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 54.4 (C-1'), 38.0 (C-5'), 32.0, 31.9, 30.0, 29.8, 29.6x2, 29.5, 29.4, 26.2, 22.7, 21.3 (C-2', C-3', (CH₂)₈, CH₃C(O)), 14.2 (CH₃). HRMS: найдено m/z 409.2698, вычислено C₂₂H₃₆N₂O₅ [M + H]⁺ 409.26697.

(\pm)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-ундецилоксиметилурацил (76). Продукт (\pm)-**76** выделяли с помощью PLC, элюируя смесью EtOAc/гексан (2:1), и получали в виде белого порошка (99 мг, 47%): R_f 0.41 (98:2 CHCl₃: MeOH). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.58 (1H, уш. с, NH), 7.49 (1H, с, H-6), 5.25-5.20 (1H, м, H-1'), 5.17-5.11 (1H, м, H-4'), 4.26 (2H, с, 5-CH₂O), 3.52 (2H, t, J = 8 Гц, CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 2.58-2.47 (1H, м, H-a5'), 2.22-2.18, 2.03-1.99 и 1.88-1.83 (4H, 3m, H-2' и H-3'), 2.09 (3H, с, Ac), 1.79-1.72 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.58 (2H, м, CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1.30-1.26 (16H, м, CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 0.87 (3H, т, J = 8 Гц, CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.2 (C (O) Ac), 162.1, 150.9 (C-4, C-2), 138.0 (C-6), 112.8 (C-5), 74.7 (C-4'), 71.5 (5-CH₂O), 64.9 (CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 54.3 (C-1'), 37.9 (C-5'), 31.9, 31.8, 30.0, 29.6x3, 29.5, 29.3, 29.03, 26.1, 22,7, 21,2 (C-2', C-3', (CH₂)₉, CH₃C(O)), 14,1 (CH₃). HRMS: найдено m/z 423.2853, вычислено C₂₃H₃₈N₂O₅ [M + H]⁺ 423.2853.

(±)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-додecilоксиметилурацил (77). Продукт **(±)-77** выделяли с помощью PLC, элюируя смесью EtOAc/гексан (2:1), и получали в виде белого порошка (100 мг, 46%): R_f 0.42 (элюирование CHCl_3 : MeOH 98:2). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.93 (1H, уш. с, NH), 7.48 (1H, с, H-6), 5.23-5.20 (1H, м, H-1'), 5.16-5.12 (1H, м, H-4'), 4.26 (2H, с, 5- CH_2O), 3.51 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.54-2.47 (1H, м, H-a5'), 2.20-2.18, 2.01-1.99 и 1.86-1.83 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2.08 (3H, с, Ac), 1.78-1.73 (1H, м, H-b5'), 1.61-1.57 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.28-1.24 (18H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 170.3 (C(O) Ac), 162.4, 151.1 (C-4, C-2), 138.1 (C-6), 113.0 (C-5), 74.9 (C-4'), 71.7 (5- CH_2O), 65.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 54.5 (C-1'), 38.1 (C-5'), 32.1, 32.0, 30.1, 29.8x2, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 26.3, 22.8, 21.4, 21.3 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_{10}$, $\text{CH}_3\text{C(O)}$), 14.2 (CH_3). HRMS: найдено m/z 437.3004, вычислено $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{NH}]^+$ 437.3010.

(±)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(азидометил)-урацил (89). NaN_3 (160 мг, 2.5 ммоль) добавляли к раствору **1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-(бромметил)урацила (87)** (165 мг, 0.5 ммоль) в сухом ДМФ (10 мл). Смесью перемешивали в течение 48 часов при 37°C в атмосфере аргона, упаривали в вакууме и остаток растворяли в CHCl_3 (5 мл), наносили на колонку с силикагелем и элюировали смесью CHCl_3 : MeOH (98: 2) с получением частично очищенного продукта **89**. Затем его дополнительно очищали с помощью PLC, элюируя смесью EtOAc/ гексан (1:1). Получили соединение **89** в виде твердого вещества белого цвета (143 мг, 97.5%). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.43 (1H, уш. с, NH), 7.54 (1H, с, H-6), 5.31-5.27 (1H, м, H-1'), 5.22-5.17 (1H, м, H-4'), 4.23 (2H, с, 5- CH_2), 2.60-2.53 (1H, м, H-a5'), 2.31-2.27, 2.10-2.05 и 1.93-1.85 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2.07 (3H, с, Ac), 1.81-1.75 (1H, м, H-b5').

Общая методика синтеза (±)-1-(4'-ацетоксициклопент-1'-ил)-5-[(4-алкил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацилов (81-83). К раствору азиды **89** (143 мг, 0.49 ммоль) и соответствующего 1-алкина (0.75 ммоль) в дихлорметане (2 мл) прибавляли раствор сульфата меди (12.4 мг, 0.05 ммоль) и аскорбината натрия (30 мг, 0.15 ммоль) в H_2O (2 мл). Реакционную смесь перемешивали 17 часов при комнатной температуре. Растворители удаляли в вакууме и продукты **81-83** выделяли методом PLC, элюируя EtOAc/гексаном (2:1).

(±)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-[(4-октил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил (81). Получили в виде твердого белого вещества (100 мг, 47.5%). R_f 0.28 (EtOAc/гексан (2:1)). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.11 (1H, с, NH), 7.76 (1H, с, H-6), 7.52 (1H, с, H^{триазол}), 5.23-5.20 (1H, м, H-1'), 5.20-5.19 (2H, м, 5- CH_2N), 5.10-5.05 (1H, м, H-4'), 2.66 (2H, т, $J = 8$ Гц,

$\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.55-2.48 (1H, м, H-а5'), 2.22-2.17, 2.03-1.99 и 1.90-1.79 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2.15 (3H, с, Ac), 1.76-1.69 (1H, м, H-b5'), 1.65-1.59 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.29-1.24 (10H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 170.37 (C(O) Ac), 162.36, 150.51 (C-4, C-2), 148.69 (C-5^{триазол}), 142.36 (C-6), 122.42 (C-4^{триазол}), 109.02 (C-5), 74.40 (C-4'), 55.19 (C-1'), 46.64 (5- CH_2N), 38.08 (C-5'), 31.91, 31.79, 30.18, 29.76, 29.34, 29.30, 29.25, 25.39, 22.71, 21.45 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_7$, $\text{CH}_3\text{C(O)}$), 14.15 (CH_3). HRMS: найдено m/z 432.2601, вычислено $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 432.2605.

(±)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-[(4-децил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил

(82). Получили в виде твердого белого вещества (143 мг, 63.5%). R_f 0.30 (EtOAc/гексан (2:1)). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.03 (1H, с, NH), 7.78 (1H, с, H-6), 7.55 (1H, с, H^{триазол}), 5.24-5.21 (3H, м, 5- CH_2N и H-1'), 5.09-5.05 (1H, м, H-4'), 2.68 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 2.56-2.48 (1H, м, H-а5'), 2.22-2.17, 2.01-1.99 и 1.89-1.80 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2.15 (3H, с, Ac), 1.76-1.69 (1H, м, H-b5'), 1.66-1.62 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 1.30-1.24 (14H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 170.38 (C(O) Ac), 162.78, 150.86 (C-4, C-2), 148.92 (C-5^{триазол}), 141.94 (C-6), 121.78 (C-4^{триазол}), 109.68 (C-5), 74.42 (C-4'), 54.99 (C-1'), 45.77 (5- CH_2N), 38.03 (C-5'), 31.93, 31.76, 30.13, 29.72, 29.63, 29.58, 29.44, 29.40, 29.35, 25.70, 22.70, 21.38 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_9$, $\text{CH}_3\text{C(O)}$), 14.12 (CH_3). HRMS: найдено m/z 460.2919, вычислено $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 460.2918.

(±)-1-(4'-Ацетоксициклопент-1'-ил)-5-[(4-додecil)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил

(83). Получили в виде твердого белого вещества (127 мг, 53%). R_f 0.32 (EtOAc/гексан (2:1)). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.30 (1H, с, NH), 7.78 (1H, с, H-6), 7.55 (1H, с, H^{триазол}), 5.21 (3H, м, 5- CH_2N и H-1'), 5.09-5.05 (1H, м, H-4'), 2.67 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.52-2.47 (1H, м, H-а5'), 2.20-2.17, 2.01-1.99 и 1.93-1.83 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 2.15 (3H, с, Ac), 1.76-1.70 (1H, м, H-b5'), 1.65-1.61 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.25-1.22 (18H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 170.38 (C(O) Ac), 162.54, 150.70 (C-4, C-2), 148.71 (C-5^{триазол}), 142.07 (C-6), 122.02 (C-4^{триазол}), 109.51 (C-5), 74.44 (C-4'), 55.06 (C-1'), 46.06 (5- CH_2N), 38.07 (C-5'), 31.98, 31.80, 30.19, 29.75, 29.71 x2, 29.62, 29.43x2, 29.41, 29.38, 25.63, 22.74, 21.43 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_{11}$, $\text{CH}_3\text{C(O)}$), 14.16 (CH_3). HRMS: найдено m/z 488.2232, вычислено $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 488.2232.

Общая методика синтеза (±)-1-(4'-гидроксициклопент-1'-ил)-5-алкилоксиметилурацилов (78-80) и (±)-1-(4'-гидроксициклопент-1'-ила)-5-[(4-алкил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацилов (84-86). К перемешиваемому раствору соответствующего ацетилированного соединения (75-77, 81-84) (0.15 ммоль) в MeOH (5

мл) добавляли K_2CO_3 (52 мг; 0.38 ммоль) и кипятили с обратным холодильником в течение 2-4 часов. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в смеси $CHCl_3:MeOH$ (95:5). Реакционную смесь концентрировали в вакууме и выделяли целевые вещества с помощью PLC, элюируя смесью $CHCl_3-MeOH$ (9:1).

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-децилоксиметилурацил (78) получили в виде твердого белого вещества (47 мг, 85%). R_f 0.47 (9:1 $CHCl_3:MeOH$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 8.72 (1H, уш. с, NH), 7.73 (1H, с, H-6), 4.98-4.94 (1H, м, H-1'), 4.39 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5- CH_2O), 3.50 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_7CH_3$), 2.36-2.34 (1H, м, H- a5'), 2.19-2.16, 1.99 - 1.89 (4H, 2м, H-2' и H-3'), 1.75-1.72 (1H, м, H-b5'), 1.61-1.57 (2H, м, $CH_2\underline{CH_2}(CH_2)_7CH_3$), 1.28-1.25 (14H, м, $CH_2CH_2(\underline{CH_2})_7CH_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $CH_2CH_2(CH_2)_7\underline{CH_3}$). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 162.50, 151.00 (C-4, C-2), 140.79 (C-6), 112.57 (C-5), 72.22 (C-4'), 71.47 (5- CH_2O), 65.00 ($\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_7CH_3$), 56.40 (C-1'), 40.47 (C-5'), 35.28, 31.98, 29.80, 29.72, 29.69, 29.65, 29.56, 29.40, 26.18, 22.75 (C-2', C-3', $(CH_2)_8$), 14.16 (CH_3). HRMS: найдено m/z 367.2592, вычислено $C_{20}H_{34}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 367.2591.

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-ундецилоксиметилурацил (79) получили в виде твердого белого вещества (51 мг, 88%): R_f 0.49 (9:1 $CHCl_3:MeOH$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 8.56 (1H, уш. с, NH), 7.72 (1H, с, H-6), 4.98-4.94 (1H, м, H-1'), 4.40 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5- CH_2O), 3.50 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_8CH_3$), 2.41-2.33 (2H, м, H-a5', OH), 2.19-2.14, 2.03-1.96, 1.94-1.87 и 1.78-1.75 (4H, 4м, H-2' и H-3'), 1.74-1.69 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.55 (2H, м, $CH_2\underline{CH_2}(CH_2)_8CH_3$), 1.29-1.25 (16H, м, $CH_2CH_2(\underline{CH_2})_8CH_3$), 0.87 (3H, т, $J = 8$ Гц, $CH_2CH_2(CH_2)_8\underline{CH_3}$). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 162.37, 150.96 (C-4, C-2), 140.68 (C-6), 112.62 (C-5), 72.24 (C-4'), 71.47 (5- CH_2O), 65.02 ($\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_8CH_3$), 56.42 (C-1'), 40.45 (C-5'), 35.32, 31.99, 29.78, 29.72, 29.71x3, 29.58, 29.42, 26.20, 22.76 (C-2', C-3', $(CH_2)_9$), 14.18 (CH_3). HRMS: найдено m/z 381.2749, вычислено $C_{21}H_{36}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 381.2748.

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-додэцилоксиметилурацил (80) получили в виде твердого белого вещества (51.5 мг, 87%): R_f 0.50 (9:1 $CHCl_3:MeOH$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 8.71 (1H, уш. с, NH), 7.72 (1H, с, H-6), 4.97-4.94 (1H, м, H-1'), 4.39 (1H, м, H-4'), 4.24 (2H, с, 5- CH_2O), 3.50 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_9CH_3$), 2.42 (1H, м, OH), 2.40-2.32 (1H, м, H-a5'), 2.20-2.13, 2.01-1.97, 1.92-1.87 и 1.78-1.75 (4H, 4м, H-2' и H-3'), 1.72-1.69 (1H, м, H-b5'), 1.60-1.55 (2H, м, $CH_2\underline{CH_2}(CH_2)_9CH_3$), 1.29-1.24 (18H, м, $CH_2CH_2(\underline{CH_2})_9CH_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $CH_2CH_2(CH_2)_9\underline{CH_3}$). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 162.41, 150.98 (C-4, C-2), 140.70 (C-6), 112.63 (C-5), 72.21 (C-4'), 71.47 (5- CH_2O), 65.01 ($\underline{CH_2}CH_2(CH_2)_9CH_3$), 56.46 (C-1'), 40.44 (C-5'), 35.31, 32.00, 29.72, 29.71x3, 29.66, 29.58, 29.52, 29.43, 26.20, 22.76 (C-2', C-3', $(CH_2)_{10}$), 14.18 (CH_3). HRMS: найдено m/z 395.2904, вычислено $C_{22}H_{38}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 395.2904.

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-[(4-октил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил (84) получили в виде твердого белого вещества (54 мг, 92%): R_f 0.49 (9:1 CHCl_3 :MeOH). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.41 (1H, с, NH), 8.22 (1H, с, H-6), 7.60 (1H, с, $\text{H}^{\text{триазол}}$), 5.28-5.19 (2H, м, 5- CH_2N), 5.13-5.07 (1H, м, H-1'), 4.40 (1H, м, H-4'), 2.67 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.33-2.25 (1H, м, H-a5'), 2.23-2.19, 1.98-1.84 и 1.67-1.64 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.74-1.70 (1H, м, H-b5'), 1.62-1.57 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.28-1.23 (10H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.85 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 162.83, 150.99 (C-4, C-2), 148.32 (C-5 $^{\text{триазол}}$), 144.15 (C-6), 122.46 (C-4 $^{\text{триазол}}$), 109.09 (C-5), 71.95 (C-4'), 55.74 (C-1'), 46.53 (5- CH_2N), 40.96 (C-5'), 35.16, 31.90, 30.72, 29.75, 29.36x2, 29.25, 25.50, 22.70 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_7$), 14.14 (CH_3). HRMS: найдено m/z 390.2501, вычислено $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 390.2500.

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-[(4-децил)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил (85) получили в виде твердого белого вещества (53 мг, 84%): R_f 0.50 (9:1 CHCl_3 :MeOH). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.30 (1H, с, NH), 8.23 (1H, с, H-6), 7.62 (1H, с, $\text{H}^{\text{триазол}}$), 5.29-5.20 (2H, м, 5- CH_2N), 5.12-5.05 (1H, м, H-1'), 4.42-4.40 (1H, м, H-4'), 2.68 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 2.34-2.26 (1H, м, H-a5'), 2.23-2.18, 1.98-1.84 и 1.70-1.65 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.77-1.73 (1H, м, H-b5'), 1.63-1.60 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 1.29-1.24 (14H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 162.97, 151.11 (C-4, C-2), 148.68 (C-5 $^{\text{триазол}}$), 143.85 (C-6), 122.08 (C-4 $^{\text{триазол}}$), 109.42 (C-5), 71.91 (C-4'), 55.66 (C-1'), 46.17 (5- CH_2N), 40.95 (C-5'), 35.10, 31.94, 30.64, 29.65, 29.61, 29.43 x2, 29.38x2, 25.69, 22.72 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_9$), 14.14 (CH_3). HRMS: найдено m/z 418.2078, вычислено $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.2813.

(±)-1-(4'-Гидроксициклопент-1'-ил)-5-[(4-додecil)-1,2,3-триазол-1-ил]-метилурацил (86), белый порошок (59 мг, 88%): R_f 0.52 (9:1 CHCl_3 :MeOH). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.88 (1H, с, NH), 8.11 (1H, с, H-6), 7.52 (1H, с, $\text{H}^{\text{триазол}}$), 5.24-5.20 (2H, м, 5- CH_2N), 5.16-5.04 (1H, м, H-1'), 4.42-4.40 (1H, м, H-4'), 2.65 (2H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.34-2.28 (1H, м, H-a5'), 2.25-2.18, 1.94-1.83 и 1.69-1.66 (4H, 3м, H-2' и H-3'), 1.73-1.70 (1H, м, H-b5'), 1.64-1.59 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.28-1.24 (18H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 0.86 (3H, т, $J = 8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 162.61, 150.85 (C-4, C-2), 148.79 (C-5 $^{\text{триазол}}$), 143.75 (C-6), 121.99 (C-4 $^{\text{триазол}}$), 109.53 (C-5), 72.07 (C-4'), 55.81 (C-1'), 46.13 (5- CH_2N), 40.94 (C-5'), 35.27, 32.00, 30.60, 29.74x3, 29.65, 29.47x2, 29.42x2, 25.76, 22.76 (C-2', C-3', $(\text{CH}_2)_{11}$), 14.18 (CH_3). HRMS: найдено m/z 446.3127, вычислено $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446.3127.

Противотуберкулезная активность соединений, описанных в данном разделе, в отношении лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и штамма *M. tuberculosis* MS-115

с множественной лекарственной устойчивостью, резистентного к действию препаратов первого ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и пиперазид), была изучена в центральном научно-исследовательском институте туберкулеза РАМН, методика опубликована [145, 250, 275, 277].

Активность соединений, описанных в данном разделе, в отношении 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) была протестирована О. В. Ефременковой в ФГБУН Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе и Карен Букхейт в ImQuest BioSciences, методики опубликованы [276].

3.2. Методики к разделу 2.2.

В этой части работы использовали бромтриметилсилан, диэтилазодикарбоксилат, трифенилфосфин, триэтилфосфоноформат и триэтилфосфоноацетат (Fluka); TPSCl, пиридин и ДМФ (Aldrich), AZT (ООО «Ассоциация АЗТ», Москва, Россия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 60 (40-63 мкм), обращенно-фазовую хроматографию - на LiChroprep RP-8 и LiChroprep RP-18 (25-40 мкм) (Merck), ионообменную хроматографию на колонке DEAE-Toyopearl (HCO₃⁻) (Toyosoda, Япония). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H (Me₄Si в качестве внутреннего стандарта для органических растворителей и 3- (триметилсилил) -1-пропансульфонат натрия для D₂O) и 162 МГц для ³¹P ЯМР (с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, 85% H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре COMPACT MALDI-4 (Kratos Analytical). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония) в метаноле при pH 7,0. Значения λ_{max} составляли 266-267 нм и 9100-9700 нм для всех синтезированных соединений.

3.2.1.1. Синтез эфиров *H*-фосфонатов

Метод А

***P*-(2,2-Диметилпропил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (93).** Раствор PCl₃ (135 мг, 88 мкл, 1 ммоль) в дихлорметане (2 мл) охладили до 1-2°C, при перемешивании добавили неопентиловый спирт (88 мг, 1 ммоль) и пиридин (80 мкл, 1 ммоль) и перемешивали 1 час при комнатной температуре. Раствор AZT (130 мг, 0.5 ммоль) в

пиридине (80 мкл) и ацетонитриле (3 мл) добавили к реакционной смеси при 4-5°C. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, разбавили холодным раствором насыщенного NaHCO_3 (3 мл) и хлороформом (5 мл). Органический слой промыли водой, сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4). Получили 94 мг (47%) соединения **93**. УФ (MeOH, $\lambda_{\text{макс}}$): 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.49 (1H, уш. с, NH), 7.28, 7.31 (1H, 2с, H₆), 6.87, 6.85 (1H, 2д, $J = 706$ Гц, P-H), 6.15 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 5.90 (1H, д, $J = 697$ Гц, H-P), 4.35 (1H, м, H3'), 4.19 (2H, м, H5'), 4.01 (1H, м, H4'), 3.71 (2H, м, P-O-CH₂), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.85, 1.86 (3H, 2с, CH₃), 0.92 (9H, с, CH₃C). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.99 с, 8.40 с.

Метод В

***P*-(Циклогексил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (97)**. Водный раствор Na-соли 5'-H-фосфоната АЗТ (176 мг, 0.5 ммоль) пропустили через колонку с Дауэкс-50 (Py^+) (1 x 8 см), элюируя водой. Элюат сконцентрировали в вакууме, растворили в пиридине (2 мл) и снова сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в смеси MeCN (3.5 мл) и пиридина (2 мл), и при перемешивании добавили циклогексиловый спирт (60 мкл, 0.55 ммоль). Смесь охладили до -10°C и добавили пивалоилхлорид (180 мкл, 0.75 ммоль), а затем сняли охлаждение, и реакционную смесь перемешивали 60 мин. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Смесь разбавили хлороформом (5 мл) и промыли насыщенным раствором NaHCO_3 (3 мл) и водой (3 x 3 мл). Органический слой сушили Na_2SO_4 , концентрировали в вакууме, а затем растворили в толуоле и снова сконцентрировали в вакууме. Продукт хроматографировали на колонке с силикагелем (15 x 2.5 см), элюируя системой $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4). Получили 128 мг (62%) соединения **97**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.51 (1H, уш. с, NH), 7.38с, 7.37 (1H, с, H₆), 6.86 (1H, д, $J = 700$ Гц, P-H), 6.15 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 4.75 (1H, м, CH), 4.35 (1H, м, H3'), 4.19 (2H, м, H5'), 4.01 (1H, м, H4'), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.92 (3H, с, CH₃), 1.90, 1.71, 1.50, 1.24 (10H, 4м, циклогексил). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 7.60 с, 8.04 с.

Метод С

***P*-(Этил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (92)**. К раствору AZT (130 мг, 0.5 ммоль) в пиридине (1 мл) добавили дифенилфосфит (287 мкл, 1.5 ммоль), раствор перемешивали 30 минут при комнатной температуре, а затем добавили этанол (500 мкл) и реакционную смесь перемешивали 4 часа при комнатной температуре. Ход реакции

контролировали по ТСХ (система А). Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя смесью CHCl_3 :MeOH (96:4). Получили 13 мг (7%) соединения **92**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.67 (1H, уш. с, NH), 7.31, 7.30 (1H, 2с, H6), 6.88 (1H, д, $J = 706$ Гц, P-H), 6.15 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 4.32 (1H, м, H3'), 4.21 (2H, д, $J = 7.0$ Гц, P-O-CH₂), 4.01 (2H, м, H5'), 3.66 (1H, м, H4'), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.88 (3H, с, CH₃), 1.18 (3H, т, CH₂-CH₃). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.42 с, 7.81 с.

***P*-(Метил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (91)** получили по методу А с выходом 67%, а по методу В с выходом 48%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.56 (1H, уш. с, NH), 7.30, 7.27 (1H, 2с, H6), 6.86 (1H, д, $J = 700$ Гц, P-H), 6.14 (1H, дт, $J = 6.0$ Гц, $J = 2.0$ Гц, H1'), 4.32 (1H, м, H3'), 4.19 (2H, м, H5'), 4.01 (1H, м, H4'), 3.78 (2H, д, $J = 12.0$ Гц, P-O-CH₃), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.87 (3H, с, CH₃). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.10 с, 7.53 с.

***P*-(Этил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (92)** получили по методу В с выходом 74%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.67 (1H, уш. с, NH), 7.31, 7.30 (1H, 2с, H6), 6.88 (1H, д, $J = 706$ Гц, P-H), 6.15 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 4.32 (1H, м, H3'), 4.21 (2H, м, $J = 7.0$ Гц, P-O-CH₂), 4.01 (2H, м, H5'), 3.66 (1H, м, H4'), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.88 (3H, с, CH₃), 1.18 (3H, т, CH₂-CH₃). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.42 с, 7.81 с.

***P*-(Бензил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (94)** получили по методу В с выходом 62%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.61 (1H, уш. с, NH), 7.48, 7.46 (1H, 2с, H6), 7.30 (5H, м, C₆H₅), 6.83 (1H, д, $J = 700$ Гц, P-H), 6.14 (1H, т, $J = 6.7$ Гц, H1'), 5.02 (2H, д, $J = 12$ Гц, P-O-CH₂), 4.49 (1H, м, H3'), 4.19 (1H, м, H4'), 4.00 (2H, м, H5'), 2.38 (2H, т, $J = 6.2$ Гц, H2'), 1.79 (3H, с, CH₃). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.75 с, 8.23 с.

***P*-[2-(2,2-Диметилпропионилтио)этил]-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (95)** получили по методу В с выходом 48%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.16 (1H, уш. с, NH), 7.36с, 7.35 (1H, с, H6), 6.87 (1H, д, $J = 713$ Гц, P-H), 6.13 (1H, т, $J = 6.5$ Гц, H1'), 4.36 (1H, м, H3'), 4.25 (2H, м, H5'), 4.10 (2H, дт, $J = 9.3$ и 6.5 Гц, P-O-CH₂), 4.00 (1H, м, H4'), 3.12 (2H, дт, $J = 1.6$ и 6.2 Гц, S-CH₂), 2.37 (2H, т, $J = 6.5$ Гц, H2'), 1.84, 1.83 (3H, 2с, CH₃), 1.20 (9H, с, (CH₃)₃C). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.82 с, 9.36 с.

***P*-(Изопропил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (96)** получили по методу В с выходом 84%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.53 (1H, уш. с, NH), 7.38с, 7.39с (1H, H6), 6.86д (1H, $J = 700$ Гц, P-H), 6.15т (1H, $J = 6.0$ Гц, H1'), 4.75м (1H,

CH), 4.35м (1H, H3'), 4.19м (2H, H5'), 4.01м (1H, H4'), 2.38т (2H, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.87с (3H, CH₃), 1.35 д (6H, $J = 6.6$ Гц, CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 10.09 с, 10.01 с.

***P*-(Холестерил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (98)** получили по методу В с выходом 70%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.54 (1H, уш. с, NH), 7.76, 7.72 (1H, 2с, H6), 6.87 (1H, д, $J = 700$ гц, P-H), 6.13 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 4.79 (1H, м, CH), 4.30 (1H, м, H3'), 4.23 (2H, м, H5'), 4.00 (1H, м, H4'), 2.43 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 2.30-2.34 (30H, м, холестерин), 1.94 (3H, с, CH₃), 0.94-1.62 (15H, м, холестерин). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м. д.): 6.57 с, 6.96 с.

***P*-(трет-Бутил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (99)** получили по методу А с выходом 80%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN), δ, м.д.: 9.15 (1H, уш. с, NH), 7.39 (1H, с, H6), 6.15 (1H, т, $J = 6.0$ Гц, H1'), 5.90 (1H, д, $J = 697$ Гц, H-P), 4.35 (1H, м, H3'), 4.19 (2H, м, H5'), 4.01 (1H, м, H4'), 2.38 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, H2'), 1.85, 1.86 (3H, 2с, CH₃), 1.50 (9H, с, (CH₃)₃C). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.62 с, 3.96 с.

***P*-(Адамантил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (100)** получили по методу В с выходом 67%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.03 (1H, уш. с, NH), 7.38, 7.37 (1H, 2с, H6), 6.90 (1H, д, $J = 696$ Гц, H-P), 6.25 (1H, т, $J = 6.1$ Гц, H1'), 4.30 (1H, м, H3'), 4.22 (2H, м, H5'), 4.04 (1H, м, H4'), 2.40 (2H, т, $J = 6.1$ Гц, H2'), 2.16 (3H, уш. с, адамантил), 2.06 (6H, м, адамантил), 1.85 (3H, с, CH₃), 1.64 (6H, м, адамантил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.36 с, 3.08 с.

***P*-(1-Метилциклопентил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (101)** получили по методу В с выходом 8%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.50 (1H, уш. с, NH), 7.29, 7.25 (1H, 2с, H6), 6.85 (1H, д, $J = 698$ Гц, H-P), 6.15 (1H, т, $J = 6.4$ Гц, H1'), 4.35 (1H, м, H3'), 4.23 (2H, м, H5'), 4.03 (1H, м, H4'), 2.40 (2H, т, $J = 6.4$ Гц, H2'), 1.90 (3H, с, CH₃ тимины), 1.35 (3H, с, CH₃), 1.33, 1.24 (8H, 2м, циклопентил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.45 с, 3.06 с.

***P*-(1-Метилциклогексил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (102)** получили по методу В с выходом 15%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 7.40, 7.35 (1H, 2с, H6), 6.95 (1H, д, $J = 696$ Гц, H-P), 6.15 (1H, т, $J = 6.4$ Гц, H1'), 4.37 (1H, м, H3'), 4.23 (2H, м, H5'), 4.03 (1H, м, H4'), 2.40 (2H, т, $J = 6.4$ Гц, H2'), 1.86 (3H, с, CH₃ тимины), 1.53 (3H, с, CH₃), 1.70, 1.33, 1.28 (10H, 3м, циклогексил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.45 с, 3.06 с.

***P*-(*n*-Мент-1-ен-8-ил)-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (103)** получили по методу В с выходом 18%. УФ (MeOH): λ_{макс} 267 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 7.37, 7.39 (1H, 2с, H6), 6.70 (1H, д, $J = 697$ Гц, H-P), 6.13 (1H, т, $J = 6.4$ Гц, H1'), 5.36 (1H, м, C=CH),

4.35 (1H, м, H3'), 4.20 (2H, м, H5'), 4.00 (1H, м, H4'), 2.37 (2H, т, $J = 6.4$ Гц, H2'), 2.12 (4H, м, (CH₂)₂), 2.03 (1H, м, CH), 1.84 (3H, с, CH₃ тимина), 1.65 (3H, с, C=C-CH₃), 1.48, 1.47 (6H, 2с, (CH₃)₂C). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.65 с, 3.23 с

***P*-(Этил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (104)** получили по методу А с выходом 54%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.87 (1H, уш. с, NH), 7.37, 7.32 (1H, 2с, H6), 6.87 (1H, д, $J = 701$ Гц, P-H), 7.03 (1H, м, H1'), 6.34 (1H, м, H2'), 5.92 (1H, м, H3'), 5.01 (1H, м, H4'), 4.27 (2H, м, H5'), 4.17 (2H, м, P-O-CH₂), 1.91 (3H, с, CH₃), 1.36 (3H, т, CH₂-CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.25 с, 7.86 с.

***P*-(2,2-Диметилпропил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (105)** получили по методу А с выходом 67%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.80 (1H, уш. с, NH), 7.27, 7.25 (1H, 2с, H6), 7.01 (1H, м, H1'), 6.85, 6.83 (1H, 2д, $J = 703$ Гц, P-H), 6.31 (1H, м, H2'), 5.91 (1H, м, H3'), 5.00 (1H, м, H4'), 4.27 (2H, м, H5'), 3.75 (2H, м, P-O-CH₂), 1.85, 1.89 (3H, 2с, CH₃), 0.93 (9H, с, (CH₃)₃C). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.56 с, 8.43 с.

***P*-[2-(2,2-диметилпропионильтио)этил]-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (106)** получили по методу А с выходом 32%. УФ (MeOH): λ_{макс} 267 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.13 (1H, уш. с, NH), 7.29, 7.27 (1H, 2с, H6), 6.82 (1H, д, $J = 707.5$ Гц, P-H), 6.90 (1H, м, H1'), 6.37 (1H, м, H2'), 5.93 (1H, м, H3'), 4.98 (1H, м, H4'), 4.21 (2H, дт, $J = 7.8$ и 3.2 Гц, P-O-CH₂), 4.08 (2H, м, H5'), 3.12 (2H, дт, $J = 1.6$ и 6.4 Гц, S-CH₂), 1.83 (3H, с, CH₃), 1.22 (9H, с, (CH₃)₃C). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.48 с, 9.39 с

***P*-(Изопропил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (107)** получили по методу А с выходом 58%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.93 (1H, уш. с, NH), 7.28, 7.26 (1H, 2с, H6), 6.85 (1H, д, $J = 701$ Гц, P-H), 6.88 (1H, м, H1'), 6.35 (1H, м, H2'), 5.95 (1H, м, H3'), 4.98 (1H, м, H4'), 4.75 (1H, м, P-O-CH), 4.09 (2H, м, H5'), 1.88 (3H, с, CH₃ тимина), 1.35 (6H, д, $J = 6.6$ Гц, CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.67 с, 7.94 с.

***P*-(Циклогексил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (108)** получили по методу А с выходом 76%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.81 (1H, уш. с, NH), 7.28, 7.27 (1H, 2с, H6), 6.86 (1H, д, $J = 702$ Гц, P-H), 6.85 (1H, м, H1'), 6.36 (1H, м, H2'), 5.96 (1H, м, H3'), 4.98 (1H, м, H4'), 4.75 (1H, м, P-O-CH), 4.10 (2H, м, H5'), 1.92 (3H, с, CH₃), 1.90, 1.71, 1.50, 1.24 (10H, 4м, циклогексил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 7.60 с, 7.24 с.

***P*-(1-Метилциклопентил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-H-фосфонат (109)** получили по методу А с выходом 8%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 8.51 (1H, уш. с, NH), 7.30, 7.25 (1H, 2с, H6), 6.84 (1H, д, $J = 698$ Гц, H-P), 7.00 (1H, м, H1'),

6.31 (1H, м, H2'), 5.92 (1H, м, H3'), 4.99 (1H, м, H4'), 4.26 (2H, м, H5'), 1.90 (3H, с, CH₃ тимина), 1.35 (3H, с, CH₃), 1.33, 1.24 (8H, 2м, циклопентил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 3.86 с, 3.45 с

***P*-(Адамантил)-2',3'-дидегидро-2',3'-дезокситимидин-5'-*H*-фосфонат (110)** получили по методу А с выходом 79%, а по методу В с выходом 84%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.37 (1H, уш. с, NH), 7.37, 7.32 (1H, 2с, H6), 6.94 (1H, д, *J* = 696 Гц, P-H), 7.03 (1H, м, H1'), 6.34 (1H, м, H2'), 5.91 (1H, м, H3'), 5.00 (1H, м, H4'), 4.27 (2H, м, H5'), 2.16 (3H, уш.с, адамантил), 2.06 (6H, м, адамантил), 1.93 (3H, с, CH₃), 1.64 (6H, м, адамантил). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 2.92 с, 2.05 с.

3.2.1.2. Оценка химической стабильности производных *H*-фосфонатов AZT и d4T

Раствор эфиров **91-110** (15-20 мг) в ацетонитриле (0.25 мл) добавляли к 0.1 М фосфатному буферу (рН 7.5, 0.25 мл) и раствор выдерживали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени (15 минут для соединений **91, 92, 94, 99, 100** и 1 час для соединений **93, 96, 97, 104-110**) из реакционной смеси отбирали аликвоты и их состав исследовали методом ТСХ (система А). Данные приведены разделе 2.2.1.2.

3.2.1.3. Исследование антивирусных свойств производных *H*-фосфонатов AZT и d4T

Анти-ВИЧ активность соединений **91-110** исследовали на МТ-4 клетках, инфицированных различными штаммами ВИЧ-1 в лаборатории проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск). Методики опубликованы[307-309].

3.2.2. Синтез производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d4T

В этой части работы использовали триметилбромсилан (Acros Organics), диэтилазодикарбоксилат, трифенилфосфин, триэтилфосфоноформиат, триэтилфосфоноацетат и дициклогексилкарбодиимид (Fluka); TPSCl, пиридин, этиламин и ДМФА (Aldrich), AZT (ООО «Ассоциация АЗТ», Москва, Россия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 60 (40-63 мкм), обращенно-фазовую хроматографию - на LiChroprep RP-8 и LiChroprep RP-18 (25-40 мкм) (Merck), ионообменную хроматографию на колонке DEAE-Toyoppearl (HCO₃-) (Toyosoda, Япония). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (Me₄Si в качестве внутреннего стандарта для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D₂O), 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, 85% H₃PO₄ в качестве

внешнего стандарта) и 100.6 МГц для ^{13}C -ЯМР (с подавлением углерод-протонного взаимодействия). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре COMPACT MALDI-4 (Kratos Analytical). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 (Япония) в метаноле при pH 7,0.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)(этоксикарбонил)фосфонат (112).

Метод А

К раствору (диэтил)этоксикарбонилфосфоната (190 мкл, 1 ммоль) в абсолютном CCl_4 (10 мл) добавили PCl_5 (210 мг, 1 ммоль), и раствор кипятили с обратным холодильником 3 часа. Растворитель удалили в вакууме, сухой остаток растворили в ДМФА (4 мл). Полученный раствор охладили до -5°C и добавили охлажденный до той же температуры раствор AZT (84 мг, 0.3 ммоль) в ДМФА (2 мл). Перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4) и выделили 121 мг соединения **112** (выход 89%). УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.98 (1H, с, NH), 7.43 (1H, м, H6), 6.27 (1H, т, $J = 7.5$ Гц, H1'), 4.4 (1H, м, H3'), 4.31 (4H, м, CH_2CH_3), 4.2 (2H, м, H5'), 4.07 (1H, м, H4'), 2.25 (2H, м, H2'), 1.88 (3H, с, CH_3), 1.57 и 1.52 (6H, 2м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -4.84 с, -4.37 с.

Метод В

Водный раствор бис(анилиниевой) соли этоксикарбонилфосфоновой кислоты (221 мг, 0.65 ммоль) пропустили через колонку с Dowex-50 (Py^+) (1 x 10 см), элюируя водой. Элюат сконцентрировали в вакууме, растворили в пиридине (2 мл) и снова сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили AZT (133 мг, 0.5 ммоль) и ДЦК (436 мг, 2 ммоль). Реакционную массу перемешивали 18 часов при комнатной температуре (контроль по ТСХ, система В), а затем разбавили водой до 100 мл и отфильтровали выпавший осадок. Фильтрат нанесли на колонку с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.15 М). Целевой продукт элюировали 0.07 М NH_4HCO_3 и получили 140 мг (69%) 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонил)фосфоната **111a** УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.58 (1H, м, H6), 6.15 (1H, т, $J = 7.5$ Гц, H1'), 4.4 (1H, м, H3'), 4.10 (2H, м, CH_2CH_3), 4.07 (3H, м, H4' и H5'), 2.38 (2H, м, H2'), 1.78 (3H, с, CH_3), 1.11 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -4.93 с.

Соединение **111a** (80 мг, 0.2 ммоль) растворили в пиридине (2 мл) и раствор сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили EtOH (0.5 мл) и TPSCl (90 мг, 0.3 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ (система А). Растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой CHCl₃:MeOH (96:4). Получили 58 мг (67%) соединения **112**.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(2-фенэтил)(этоксикарбонил)фосфонат (113) получили по методу В с выходом 53%. УФ (MeOH, λ_{макс}): 266 нм. ¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 9.05 (1H, с, NH), 7.36 (1H, м, H6), 7.19-7.29 (5H, м, Ph), 6.23 (1H, т, *J* = 7.5 Гц, H1'), 4.47 (2H, м, H5'), 4.30 (5H, м, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂Ph и H3'), 3.97 (1H, м, H4'), 3.04 (2H, т, *J* = 6.8 Гц, CH₂Ph), 2.25 (2H, м, H2'), 1.88 (3H, с, CH₃), 1.32 (3H, м, CH₂CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): -4.13 с, -4.32 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(изопропил)(этоксикарбонил)фосфонат (114) получили по методу В с выходом 40%. УФ (MeOH): λ_{макс} 267 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.38 (1H, с, NH), 7.39 (1H, м, H6), 6.15 (1H, м, H1'), 4.85 (1H, м, H3'), 4.36 (3H, м, H5' и CH(CH₃)₂), 4.30 (2H, м, CH₂CH₃), 4.06 (1H, м, H4'), 2.38 (2H, м, H2'), 1.85 (3H, с, CH₃), 1.36 (6H, д, *J* = 5.9 Гц, CH(CH₃)₂), 1.31 (3H, м, CH₂CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): -4.53 с, -4.70 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(циклогексил)(этоксикарбонил)фосфонат (115) получили по методу В с выходом 54%. УФ (MeOH): λ_{макс} 266 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.57 (1H, с, NH), 7.40 (1H, м, H6), 6.16 (1H, м, H1'), 4.59 (1H, м, H3'), 4.37 (3H, м, -CH₂CH₃ и CH(циклогексил)), 4.30 (2H, м, H5'), 4.05 (1H, м, H4'), 2.39 (2H, м, H2'), 1.85 (3H, с, CH₃), 1.70, 1.58-1.48, 1.33, 1.28 (10H, 4м, циклогексил), 1.30 (3H, м, CH₂CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): -4.98 с, -5.33 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(адамантил)(этоксикарбонил)фосфонат (116) получили по методу В с выходом 28%. УФ (MeOH): λ_{макс} 265 нм. ¹H ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): 9.17 (1H, с, NH), 7.40 (1H, м, H6), 6.15 (1H, м, H1'), 4.39 (1H, м, H3'), 4.32 (2H, м, H5'), 4.28 (2H, м, CH₂CH₃), 4.04 (1H, м, H4'), 2.39 (2H, м, H2'), 2.22 (3H, уш.с, адамантил), 2.14 (6H, м, адамантил), 1.85 (3H, с, CH₃), 1.65 (6H, м, адамантил), 1.30 (3H, м, CH₂CH₃). ³¹P ЯМР (CD₃CN, δ, м.д.): -8.68 с, -9.13 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(2-фенэтил)(метоксикарбонил)фосфонат (117). Водный раствор дициклогексиламмонийной соли метоксикарбонилфосфоновой кислоты (209 мг, 0.65 ммоль) пропустили через колонку с Dowex-50 (Py⁺) (1 x 10 см), элюируя водой. Элюат сконцентрировали в вакууме, растворили в пиридине (2 мл) и снова

сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили AZT (133 мг, 0.5 ммоль) и ДЦК (436 мг, 2 ммоль). Реакционную массу перемешивали 18 часов при комнатной температуре, а затем разбавили водой до 100 мл и отфильтровали выпавший осадок. Фильтрат нанесли на колонку с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.15 М). 3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(метоксикарбонил)фосфонат **111b** элюировали 0.07 М NH_4HCO_3 . Выход соединения **111b** составил 67% (135 мг). УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.59 (1H, м, H6), 6.14 (1H, т, $J = 7.5$ Гц, H1'), 4.4 (1H, м, H3'), 4.10 (3H, м, H4' и H5'), 3.65 (3H, с, CH_3), 2.38 (2H, м, H2'), 1.78 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -4.92 с.

Соединение **111b** (80 мг, 0.2 ммоль) растворили в пиридине (2 мл) и раствор сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили 2-фенилэтанол (120 мкл, 1 ммоль) и TPSCl (90 мг, 0.3 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой CHCl_3 :MeOH (96:4). Получили 60 мг соединения **117** (выход 61%). УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.52 (1H, с, NH), 7.36 (1H, м, H6), 7.19-7.29 (5H, м, Ph), 6.21 (1H, т, $J = 7.5$ Гц, H1'), 4.49 (2H, м, H5'), 4.28 (3H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ и H3'), 3.99 (1H, м, H4'), 3.83 и 3.82 (3H, 2с, CH_3), 3.04 (2H, т, $J = 6.8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.25 (2H, м, H2'), 1.89 и 1.88 (3H, 2с, CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -4.25 с, -4.45.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(этоксикарбонил)фосфонат (118).

К раствору диэтил(этоксикарбонил)фосфоната (190 мкл, 1 ммоль) в абсолютном CCl_4 (10 мл) добавляли PCl_5 (210 мг, 1 ммоль). Кипятили с обратным холодильником 3 часа. Растворитель удалили в вакууме, сухой остаток растворили в ДМФА (4 мл). Полученный раствор охладили до -5°C и добавили охлажденный до той же температуры раствор d4T (71 мг, 0.3 ммоль) в ДМФА (2 мл). Перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой CHCl_3 :MeOH (96:4). Получили 76 мг соединения **118** (выход 65%). УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.50 (1H, с, NH), 7.29 и 7.28 (1H, 2с, H6), 7.01 (1H, м, H1'), 6.33 (1H, м, H2'), 5.90 (1H, м, H3'), 5.00 (1H, м, H4'), 4.43 (2H, м, H5'), 4.31 (4H, м, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.89 (3H, с, CH_3), 1.38 и 1.33 (6H, 2т, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$). ^{31}P ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): -3.56 с, -3.85 с.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(2-фенэтил)(метоксикарбонил)фосфонат (119). Водный раствор дициклогексиламмонийной соли метоксикарбонилфосфоновой кислоты (209 мг, 0.65 ммоль) пропустили через колонку с Dowex-50 (Py^+) (1 x 10 см), элюируя водой. Элюат сконцентрировали в вакууме, растворили в пиридине (2 мл) и снова сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили d4Т (119 мг, 0.5 ммоль) и ДЦК (436 мг, 2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 18 часов при комнатной температуре, а затем разбавили водой до 100 мл и отфильтровали выпавший осадок. Фильтрат нанесли на колонку с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.15 М). 2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(метоксикарбонил)фосфонат **120b** элюировали 0.07 М NH_4HCO_3 . Выход продукта **120b** составил 64% (110 мг). УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.59 (1H, м, H6), 6.14 (1H, т, $J = 7.5$ Гц, H1'), 4.4 (1H, м, H3'), 4.10 (3H, м, H4' и H5'), 3.65 (3H, с, CH_3), 2.38 (2H, м, H2'), 1.78 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -4.92 с.

Соединение **120b** (80 мг, 0.2 ммоль) растворили в пиридине (2 мл) и раствор сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили 2-фенилэтанол (120 мкл, 1 ммоль) и TPSCl (90 мг, 0.3 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4). Получили 60 мг (61%) соединения **119**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 8.64 (1H, с, NH), 7.29 и 7.28 (1H, 2с, H6), 7.19-7.27 (5H, м, Ph), 7.01 (1H, м, H1'), 6.33 (1H, м, H2'), 5.90 (1H, м, H3'), 5.00 (1H, м, H4'), 4.43 (2H, м, H5'), 4.28 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 3.83 и 3.82 (3H, 2с, CH_3), 3.04 (2H, т, $J = 6.8$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.89 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -3.78 с, -3.94 с

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)(аминокарбонил)фосфонат (121). К соединению **111a** (80 мг, 0.2 ммоль) добавили 25% водный аммиак (3 мл), полученный раствор перемешивали 2 часа при комнатной температуре, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в воде и хроматографировали на DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.2 М), целевой продукт элюировали 0.12 М NH_4HCO_3 . Получили 70 мг (94%). 3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-аминокарбонилфосфонат **127**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д.): 7.82 (1H, м, H6), 7.17 и 7.13 (2H, 2с, NH_2), 6.12 (1H, т, $J = 6.9$ Гц, H1'), 4.5 (1H, м, H3'), 3.95 (3H, м, H4' и H5'), 2.30 (2H, м, H2'), 1.81 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д.): -1.56 с.

Соединение **127** (70 мг, 0.19 ммоль) растворили в пиридине (2 мл) и раствор сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и добавили EtOH (0.5 мл) и TPSCl (90 мг, 0.3 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой CHCl_3 :MeOH (96:4). Получили 54 мг (72%) соединения **121**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , δ , м.д.): 11.3 (1H, с, NH), 8.24 (2H, м, NH_2), 7.51 и 7.49 (1H, 2с, H6), 6.13 (1H, т, $J = 6.8$ Гц, H1'), 4.50 (1H, м, H3'), 4.27 (2H, м, H5'), 4.16 (2H, м, CH_2CH_3), 4.03 (1H, м, H4'), 2.40 (2H, м, H2'), 1.79 (3H, с, CH_3), 1.27 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (DMSO-d_6 , δ , м.д.): -0.12 с, -0.38 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)(метиламинокарбонил)фосфонат (122). К соединению **111a** (80 мг, 0.2 ммоль) добавили 25% водный метиламин (3 мл), полученный раствор перемешивали 1 час при комнатной температуре, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в воде и хроматографировали на DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.2 М), целевой продукт элюировали 0.12 М NH_4HCO_3 . Получили 71 мг (91%) 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-метиламинокарбонилфосфоната **128**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.52 (1H, с, H6), 6.06 (1H, т, $J = 6.7$ Гц, H1'), 4.32 (1H, м, H3'), 4.01 (3H, м, H4' и H5'), 2.61 (3H, с, CH_3NH), 2.32 (2H, м, H2'), 1.72 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.40 с.

Продукт **122** синтезировали из соединения **128** по методу, описанному для амида **121**, с выходом 64%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.47 (1H, с, NH), 7.72 (1H, м, CH_3NH), 7.43 (1H, с, H6), 6.22 (1H, т, $J = 6.8$ Гц, H1'), 4.40 (3H, м, H3' и H5'), 4.22 (2H, м, CH_2CH_3), 4.01 (1H, м, H4'), 2.91 и 2.89 (3H, с, CH_3N), 2.39 (2H, м, H2'), 1.94 и 1.93 (3H, с, CH_3), 1.37 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -0.10 с, -0.54 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)[(2-фенэтиламино)карбонил]фосфонат (123). Раствор соединения **111a** (80 мг, 0.2 ммоль) в фенилэтиламине (1 мл) перемешивали 4 часа при комнатной температуре, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в воде и хроматографировали на DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0.2 М), целевой продукт элюировали 0.12 М NH_4HCO_3 . Получили 82 мг (86%) 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-[(2-фенэтиламино)карбонил]фосфоната **129**. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.42 (1H, с, H6), 7.10 (5H, м, C_6H_5), 6.02 (1H, т, $J = 6.5$ Гц, H1'), 4.17 (1H, м, H3'), 3.90 (1H, м, H4'), 3.81 (2H, м, H5'), 3.39 (2H, м, CH_2NH), 2.69 (2H, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2.24 (2H, м, H2'), 1.68 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.57 с.

Продукт **123** синтезировали из соединения **129** по методу, описанному для амида **121** с выходом 70%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 9.43 (1H, с, NH), 7.62 (1H, м, CH_2NH), 7.41 и 7.40 (1H, с, H6), 7.25 (5H, м, C_6H_5), 6.15 (1H, т, $J = 6.8$ Гц, H1'), 4.33 (1H, м, H3'), 4.27 (2H, м, H5'), 4.12 (2H, м, CH_2CH_3), 4.00 (1H, м, H4'), 3.53 (2H, с, CH_2NH), 2.84 (2H, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2.36 (2H, м, H2'), 1.86 и 1.84 (3H, с, CH_3), 1.28 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 0.04 с, -0.40 с. ^{13}C -ЯМР (D_2O): 186.5 (д, $^1J_{\text{C,P}}$ 212.1, C(O)P), 169.1 (с, C4), 154.3 (с, C2), 141.8 (с, (ipso-Ph)), 139.9 (с, C6), 131.6 (с, o-Ph), 131.4 (с, m-Ph), 129.3 (с, p-Ph), 114.4 (с, C5), 87.7 (с, C1'), 85.6 (д, $^3J_{\text{C,P}}$ 7.2, C4'), 67.5 (д, $^2J_{\text{C,P}}$ 4.8, C5'), 63.0 (с, C3'), 42.5 (с, $\text{CH}_2\text{NHC(O)P}$), 39.2 (с, C2'), 37.0 (с, CH_2Ph), 14.4 (с, 5-Me).

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(аминокарбонил)фосфонат (124).

Продукт **124** синтезировали из соединения **119a** по методу, описанному для амида **121**. В качестве промежуточного продукта выделяли **2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(аминокарбонил)фосфонат 130**. Выход соединения **130** составил 94%. УФ (MeOH, $\lambda_{\text{макс}}$): 266 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.51 (1H, с, H6), 6.87 (1H, м, H1'), 6.41 (1H, м, H2'), 5.90 (1H, м, H3'), 5.03 (1H, м, H4'), 4.09 (2H, м, H5'), 1.81 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.62 с.

Продукт **124**: выход 42%. УФ (MeOH, $\lambda_{\text{макс}}$): 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 7.35 (1H, с, H6), 6.96 (1H, м, H1'), 6.37 (1H, м, H2'), 5.94 (1H, м, H3'), 5.02 (1H, м, H4'), 4.37 (2H, м, H5'), 4.19 (2H, м, CH_2CH_3), 1.88 (3H, с, CH_3), 1.35 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 0.15 с, -0.12 с.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(метиламинокарбонил)фосфонат

(125). Продукт **125** синтезировали из соединения **119a** по методу, описанному для амида **122**. В качестве промежуточного продукта выделяли **2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(N-метиламинокарбонил)фосфонат 131**. Выход соединения **131** составил 92%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.43 (1H, с, H6), 6.85 (1H, м, H1'), 6.35 (1H, м, H2'), 5.86 (1H, м, H3'), 4.97 (1H, м, H4'), 4.03 (2H, м, H5'), 2.61 (3H, с, CH_3NH), 1.76 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.53 с.

Продукт **125**: выход 48%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): 7.53 (1H, с, NH), 7.33 и 7.31 (1H, 2с, H6), 7.00 (1H, м, H1'), 6.28 (1H, м, H2'), 5.88 (1H, м, H3'), 4.97 (1H, м, H4'), 4.41 (2H, м, H5'), 4.19 (2H, м, CH_2CH_3), 2.87 и 2.86 (3H, с, CH_3NH), 1.91 (3H, с, CH_3), 1.34 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -0.27 с, -0.76 с.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)[(2-

фенилэтил)аминокарбонил]фосфонат (126). Продукт **126** синтезировали из соединения **119a** в две стадии. На первой стадии по методу, описанному для амида **123**, получали

2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(2-фенилэтиламинокарбонил)фосфонат

132, который выделяли колоночной хроматографией на DEAE-Toyopearl в линейном градиенте NH_4HCO_3 (0-0,2 М). Выход составил 86%. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.43 (1H, с, H6), 7.40-7.17 (5H, м, Ph), 6.89 (1H, м, H1'), 6.25 (1H, м, H2'), 5.86 (1H, м, H3'), 4.95 (1H, м, H4'), 4.10 (2H, м, H5'), 3.60 (2H, м, CH_2N), 2.61 (2H, т, $J = 7$ Гц, CH_2Ph), 1.86 (3H, с, CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): -1.47 с.

Продукт **126** был получен из **132** и этанола по методу, описанному для амида **121** с выходом 51%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.17 (1H, с, NH-Thy), 7.45 (1H, с, CH_2NH), 7.33 и 7.31 (1H, 2с, H6), 7.45-7.17 (5H, м, Ph), 6.99 (1H, уш. с, H1'), 6.27 и 6.17 (1H, 2м, H2'), 5.84 (1H, м, H3'), 4.91 (1H, м, H4'), 4.29 (2H, м, H5'), 4.09 (2H, м, CH_2CH_3), 3.62 (2H, м, CH_2N), 2.85 (2H, т, $J = 7$ Гц, CH_2Ph), 1.90 и 1.91 (3H, 2с, CH_3 -Thy), 1.29 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): -2.39 с, -3.00 с

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-аминокарбонилфосфонат (127). 3'-Азидо-3'-

дезокситимидин-5'-(этоксикарбонил)фосфонат **111a** (0.2 ммоль) выдерживали 18 ч при комнатной температуре в 25% водном растворе аммиака (5 мл). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде (0→0.1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-18 и элюировали водой. Целевые фракции упаривали. Выход 94%. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 7.82 (1H, м, H6), 7.17 (1H, с, NH_2 , H_a), 7.13 (H, с, NH_2 , H_b), 6.12 (1H, т, J 6.9, H1'), 4.50 (1H, м, H3'), 3.95 (3H, м, H4', H5'), 2.30 (2H, м, H2'), 1.81 (3H, уш.с, 5- CH_3). ^{31}P -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): -1.56 (с).

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)этоксикарбонилметилфосфонат (133)

получали из AZT и триэтилфосфоацетата методом А с выходом 72%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 9.52 и 9.50 (1H, с, NH), 7.45 и 7.37 (1H, 2с, H6), 6.21 (1H, т, $J = 6.5$ Гц, H1'), 4.33 (3H, м, H3' + H5'), 4.17 (4H, м, 2 CH_2CH_3), 4.01 (1H, м, H4'), 3.01 (2H, д, $J = 21.2$ Гц, CH_2P), 2.37 (2H, м, H2'), 1.91 и 1.90 (3H, 2с, CH_3 -Thy), 1.34 и 1.26 (6H, 2т, $J = 7.2$ Гц, 2 CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 21.44 с, 20.82 с. Mass: m/e [M^+] 445.1.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)этоксикарбонилметилфосфонат

(135) получали из d_4T и триэтилфосфоацетата методом А с выходом 67%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.98 (1H, с, NH), 7.34 и 7.27 (1H, 2с, H6), 7.00 (1H, м, H1'), 6.32 (1H, м, H3'), 5.88 (1H, м, H2'), 4.99 (1H, м, H4'), 4.49-4.28 (2H, м, H5'), 4.17-4.12 (4H, м, 2 CH_2CH_3), 2.97-2.90

(2H, м, CH₂P), 1.90 (3H, с, CH₃-Thy), 1.30 и 1.25 (6H, 2т, $J = 7.2$ Гц, 2CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CDCl₃): 21.21 с, 21.03 с. Mass: m/e [M⁺] 402.1.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этил)(аминокарбонилметил)фосфонат (134) получали в три стадии. На первой из AZT и пиридиниевой соли этоксикарбонилметилфосфоновой кислоты в присутствии ДЦК, в условиях, описанных для **111a**, получали **3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонилметил)фосфонат** с выходом 69%. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.77 (1H, с, H6), 6.32 (1H, т, $J = 6.6$ Гц, H1'), 4.55 (1H, м, H3'), 4.27-4.19 (5H, м, H4' + H5' + CH₂CH₃), 2.96 (2H, д, $J = 20.6$ Гц, CH₂P), 2.57 (2H, м, H2'), 1.99 (3H, уш.с, CH₃-Thy), 1.31 (3H, т, $J = 7.2$ Гц, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 15.09 с.

Раствор полученного **3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонилметил)фосфоната** (85 мг, 0,2 ммоль) в 25% -ном водном растворе аммиака (3 мл) выдерживали 18 ч при 20°C и упаривали. Остаток растворяли в воде и делили на колонке DEAE-Тоуорpearl в линейном градиенте NH₄HCO₃ (0-0,1 М) с получением 54 мг (68%) **3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(аминокарбонилметил)фосфоната**. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.56 (1H, с, H6), 6.10 (1H, т, $J = 6.6$ Гц, H1'), 4.35 (1H, м, H3'), 4.03-4.00 (3H, м, H4' + H5'), 2.63 (2H, д, $J = 20.6$ Гц, CH₂P), 2.34 (2H, м, H2'), 1.76 (3H, с, CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 16.26 с.

Продукт **134** синтезировали из **3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(аминокарбонилметил)фосфоната** и этанола в условиях, описанных для **121**, с выходом 77%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 10.03 (1H, с, NH-Thy), 7.48 и 7.44 (1H, 2кв, $J = 1$ Гц, H6), 6.68 (1H, с, H_a(NH₂)), 6.44 и 6.43 (1H, 2с, H_b(NH₂)), 6.12 и 6.13 (1H, 2т, $J = 6.5$ Гц, H1'), 4.47 и 4.42 (1H, 2м, H3'), 4.31-4.23 (2H, м H5'), 4.15 (2H, м, CH₂CH₃), 4.03 (1H, м, H4'), 2.94 и 2.93 (2H, 2д, $J = 21.5$ Гц, CH₂P), 2.39 (2H, м, H2'), 1.84 (3H, уш.с, CH₃-Thy), 1.30 (3H, т, $J = 7$ Гц, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): 24.36 с, 24.03 с. Mass: m/e [M⁺] 416.1.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(аминокарбонилметил)фосфонат (136) получали в три стадии аналогично **134**, исходя из d₄T. **2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5' (этоксикарбонилметил)фосфонат** был получен с выходом 78%. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.45 (1H, кв, $J = 1$ Гц, H6), 6.78 (1H, м, H1'), 6.31 (1H, м, H2'), 5.79 (1H, м, H3'), 4.91 (1H, м, H4'), 3.93 (4H, м, H5' + CH₂CH₃), 2.63 (2H, д, $J = 20.4$ Гц, CH₂P), 1.72 (3H, д, CH₃-Thy), 1.04 (3H, т, $J = 7.2$ Гц, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 14.86 с.

Обработка **2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этоксикарбонилметил)фосфоната** 25% водным раствором аммиака дала **2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(аминокарбонилметил)фосфонат** с выходом 94%. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.45 (1H, с, H6), 6.78 (1H, м, H1'), 6.31 (1H, м, H2'), 5.79 (1H, м, H3'),

4.91 (1H, м, H4'), 3.93 (2H, м, H5'), 2.63 (2H, д, $J = 20.4$ Гц, CH₂P), 1.72 (3H, уш.с, CH₃-Thy). ³¹P-ЯМР (D₂O): 16.86 с.

Продукт **136** получали из **2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(аминокарбонилметил) фосфоната** и этанола в условиях, описанных для **121**, с выходом 67%. ¹H-ЯМР (CD₃CN): 10.02 (1H, с, NH-Thy), 8.78 (1H, с, NH), 7.32 и 7.29 (1H, 2с, H6), 6.89 (1H, м, H1'), 6.37 (1H, м, H3'), 5.92 (1H, м, H2'), 4.98 (1H, м, H4'), 4.28-4.18 (2H, м, H5'), 4.17-4.02 (2H, м, CH₂CH₃), 2.85-2.79 (2H, м, CH₂P), 1.85 and 1.84 (3H, 2с, CH₃-Thy), 1.25 (6H, м, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (CD₃CN): 25.36 с, 25.16 с. Mass: m/e [M⁺] 373.1.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этиламино)карбонилфосфонат (137), аммониевая соль. К 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонил)фосфонату **111a** (430 мг, 1 ммоль) прибавляли 70% водный раствор этиламина (5 мл). Выдерживали 18 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2.6 × 21 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH₄HCO₃ (0 → 0.15 M). Получили 390 мг (96%) целевого соединения **137**. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.64 (1H, с, H6), 6.22 (1H, т, J 6.5, H1'), 4.44 (1H, м, H3'), 4.14 (3H, м, H5' и H4'), 3.22 (2H, кв, $J = 7.2$ Гц, CH₃CH₂N), 2.46 (2H, м, H2'), 1.87 (3H, с, 5-Me), 1.08 (3H, т, $J = 7.2$ Гц, CH₃CH₂N). ³¹P-ЯМР (D₂O): -1.25 с.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(бутиламино)карбонилфосфонат (138), аммониевая соль. К 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонил)фосфонату **111a** (80 мг, 0.2 ммоль) прибавляли н-бутиламин (1 мл). Выдерживали 18 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2.6 × 21 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH₄HCO₃ (0 → 0.15 M). Получали 78 мг (91%) целевого соединения **138**. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.65 (1H, с, H6), 6.22 (1H, т, J 6.5, H1'), 4.44 (1H, м, H3'), 4.18 (2H, м, H5'), 4.11 (1H, м, H4'), 3.20 (2H, дд, J 6.9 и 7.2, CH₂N (бутил)), 2.45 (2H, м, H2'), 1.88 (3H, с, 5-Me), 1.44 (2H, м, CH₂CH₂N (бутил)), 1.26 (6H, м, CH₂CH₃ (бутил)), 0.83 (3H, дд, J 6.5 и 6.9, CH₃ (бутил)). ³¹P-ЯМР (D₂O): -1.27 с. ¹³C-ЯМР (D₂O): 186.8 (д, ¹J_{C,P} 212.1, C(O)P), 169.2 (с, C4), 154.4 (с, C2), 140.1 (с, C6), 114.4 (с, C5), 87.7 (с, C1'), 85.6 (д, ³J_{C,P} 7.2, C4'), 67.7 (д, ²J_{C,P} 4.8, C5'), 63.0 (с, C3'), 41.4 (д, ³J_{C,P} 6.4, CH₂NHC(O)P), 39.1 (с, C2'), 33.3 (с, CH₂CH₂CH₃), 22.2 (с, CH₂CH₂CH₃), 15.7 (с, CH₂CH₂CH₃) 14.4 (с, 5-Me).

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-[(гексиламино)карбонил]фосфонат (139). 3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-(этоксикарбонил)фосфонат **111a** (0.2 ммоль) выдерживали 18 ч при комнатной температуре в фенетилаmine (2 мл). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 × 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH₄HCO₃ в воде (0→0.1 M). Целевые фракции упаривали, остаток

растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Целевые фракции упаривали. Выход 82%. ^1H -ЯМР (CD_3OD): 7.75 (1 H, c, H6), 6.21 (1 H, т, J 6.5, H1'), 4.49 (1 H, м, H3'), 4.18 (2 H, м, H5'), 4.06 (1 H, м, H4'), 3.24 (2 H, дд, J 6.9 и 7.2, CH_2N , Hex), 2.49–2.33 (2 H, м, H2'), 1.92 (3 H, c, 5-Me), 1.52 (2 H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, Hex), 1.29 (6 H, м, $(\text{CH}_2)_3$, Hex), 0.88 (3 H, dd, J 6.5 и 6.9, CH_3 , Hex); ^{31}P -ЯМР (CD_3OD): –0.44 с; ^{13}C -ЯМР (CD_3OD): 174.2 (д, $^1\text{J}_{\text{C,P}}$ 212.1, C(O)P), 166.4 (с, C4), 152.3 (с, C2), 137.9 (с, C6), 112.2 (с, C5), 86.0 (с, C1'), 84.6 (д, $^3\text{J}_{\text{C,P}}$ 7.6, C4'), 66.3 (д, $^2\text{J}_{\text{C,P}}$ 4.6, C5'), 62.4 (с, C3'), 39.8 (д, $^3\text{J}_{\text{C,P}}$ 6.9, $\text{CH}_2\text{NHC(O)P}$), 37.9 (с, C2'), 32.4, 30.2, 27.5, 23.4 (4 с, $(\text{CH}_2)_4$), 14.3 (с, Me (Hex)), 12.5 (с, 5-Me).

3.2.3. Оценка стабильности производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d₄T

Гидролиз соединений **112-126** и **133-136** проводили в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,2 и 20°C при концентрации исследуемого вещества 0,5 мМ. Аликвоты (10 мкл) отбирали через определенные интервалы и замораживали в жидком азоте, а продукты анализировали с помощью ВЭЖХ. Химическую стабильность амида **121** дополнительно изучали в 0,05 М натрий-фосфатном буфере при 37°C и pH в диапазоне 5,5-7,8 (концентрация амида **121** составляла 0,45 мМ). Реакционную смесь обрабатывали и анализировали с помощью ВЭЖХ. Ферментативный гидролиз амида **121** изучали в смеси (200 мкл), содержащей 0,1 М трис-НСl буфер (pH 7,5), 5 мМ MgCl_2 и 0,45 мМ амид **121**, инкубированных при 37°C в присутствии фосфодиэстеразы змеиного яда (0,1 мг / мл) или змеиного яда *Crotalus atrox* (1 мг / мл). Реакционную смесь обрабатывали и анализировали с помощью ВЭЖХ. Реакционную смесь (200 мкл), содержащую 0,1 М ацетатный буфер (pH 6,0), 0,45 мМ амид **121** и фосфодиэстеразу селезенки телянка (0,5 мг / мл), инкубировали при 37°C. Реакционную смесь обрабатывали и анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Реакционную смесь (200 мкл), содержащую 0,02 М трис-НСl-буфер (pH 7,2), 0,45 мМ амид **121** и нуклеазу P1 (0,1 мг / мл), инкубировали при 37°C. Реакционную смесь обрабатывали и анализировали с помощью ВЭЖХ.

ВЭЖХ проводили на хроматографе Gilson (Франция) с интегратором LKB 2220. Использовали колонку Nucleosil 100 C-18 (5 мкм) (4 150 мм) и две системы элюирования. (а) Буфер А: 0,065 М NaH_2PO_4 ; буфер В: 72% этанол; градиент: 0-5 мин, 0% В; 5-10 мин, 0-15% В; 10-30 мин, 15-25% В; 30-35 мин, 25-100% В. Скорость потока 0,5 мл / мин. (b) Буфер А: 50 мМ ТЕАВ; буфер В: 70% этанол; градиент: 0-5 мин, 0% В; 5-30 мин, 0-30% В; 30-40 мин, 30-32% В; 40-45 мин, 32-100% В. Скорость потока 0,5 мл / мин.

Химическую стабильность соединений 127, 129, 138 и 139 в концентрации 0,5 мМ изучали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере при 37°C и pH в диапазоне от 5,5 до 8,5. Аликвоты (10 мкл) отбирали через определенные промежутки времени, замораживали в жидком азоте, и продукты анализировали на жидкостном хроматографе Gynkotek GmbH (Мюнхен, Германия), снабженном УФ-детектором (модель 320) на длине волны 265 нм. Хроматографические условия: колонка Ultrasphere ODS-IP (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния), 5 мкм, 4,6 × 150 мм; подвижная фаза: ацетонитрил / 0,1% фосфорная кислота, содержащая 0,2% триэтиламина, pH 2,7-2,9. Соотношения компонентов подвижной фазы были индивидуальными для каждого соединения (см. таблицу 25).

Таблица 25. Соотношения компонентов подвижной фазы

| Соединение | Ацетонитрил | 0,1% Фосфорная кислота, содержащая 0,2% триэтиламина | Время удерживания | |
|------------|-------------|---|-------------------|------|
| | | | Соединение | AZT |
| | | | мин. | мин. |
| 127 | 7 | 93 | 4.4 | 14.6 |
| 129 | 20 | 80 | 4.1 | 2.2 |
| 138 | 15 | 85 | 5.8 | 3.5 |
| 139 | 25 | 75 | 8.1 | 1.8 |

Стабильность в цельной крови соединений 127, 129, 138 и 139.

Водные растворы соединений **127, 129, 138 и 139** (10–20 мкл, 1 мкг / мкл) помещали в пробирки с Na-гепарином; свежую цельную кровь собаки (2 мл) добавляли в каждую пробирку; и пробирки хранили при 37°C. Аликвоты отбирали каждые 1 ч в течение 6 ч и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g для отделения плазмы. К надосадочной жидкости (0,25 мл) добавляли метанол (0,5 мл), смесь встряхивали в течение 30 с и снова центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g. Супернатант упаривали в вакууме при 40°C. Сухой остаток растворяли в воде и анализировали, как описано выше в разделе «Химическая стабильность».

3.2.4. Оценка антивирусных свойств производных фосфоноформиатов и фосфоноацетатов AZT и d₄T

Анти-ВИЧ активность соединений исследовали на МТ-4 клетках, инфицированных различными штаммами ВИЧ-1 в лаборатории проф. А. Г. Покровского (НПО "Вектор", Новосибирск). Методики опубликованы [314, 318, 320].

3.2.5. Методики к главе «Оптимизация синтеза 5'-аминокарбонилфосфоната AZT 127»

В данной части работы использовали следующие реактивы и растворители: триэтилфосфоформат, триметилбромсилан, фосфористая кислота, этилхлорформат, гексаметилдисилазан, трихлорид фосфора, трихлорид алюминия, тионилхлорид, пиридин (Fluka, Германия), 32% водный аммиак (Merck, Германия), диметилформамид, триметилхлорсилан, пентахлорид фосфора (Aldrich, США), калий йодистый (Реахим, Россия), тетрахлорметан, ацетонитрил (Lecbiopharm, Россия), AZT (ЗАО "Ассоциация АЗТ", Москва). Обращенно-фазовую колоночную хроматографию проводили на LiChroprep RP-8 и LiChroprep RP-18 (25-40 мкм) фирмы Merck, ионообменную колоночную хроматографию - на DEAE-Toyopearl (HCO_3^-) (Toyosoda, Япония). УФ-поглощающие фракции анализировали методом ЯМР-спектроскопии, целевые фракции лиофилизировали. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ ("Merck", Германия) в системах: хлороформ: метанол (95:5) – система А; диоксан: 25% водный аммиак (4:1) – система Б. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J, Гц) регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для ^1H -ЯМР (внутренний стандарт Me_4Si для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D_2O), 162 МГц для ^{31}P -ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия, внешний стандарт - 85% фосфорная кислота) и 100,6 МГц для ^{13}C -ЯМР (с подавлением углерод-протонного взаимодействия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC.

Дихлорангидрид этоксикарбонилфосфоновой кислоты.

Метод А

К трихлориду алюминия (12 г, 0,091 моль) добавили трихлорид фосфора (4,4 мл 0,05 моль) и при охлаждении до 0°C прибавили хлоругольный эфир (5,28 мл 0,055 моль). Реакционную смесь оставляли на 18 часов при 23°C до полного растворения трихлорида алюминия. Затем добавили CCl_4 (160 мл, 1,655 моль) и поставили перемешиваться в ледяную баню. В ходе реакции целевой продукт не был получен (по данным ЯМР).

Метод Б.

К триэтилфосфоноформату (50 мл, 0,264 моль) добавляли пентахлорид фосфора (110 г; 0,53 моль), раствор приобретал ярко-желтую окраску, происходило слабое разогревание реакционной массы, выделялся хлористый этил. Реакционную смесь оставляли на 18 часов при 23°C. Затем перегоняли при 3 мм рт. ст., целевую фракцию собирали при 72,5°C (6,95 г). Выход 31,13%. ^1H -ЯМР(CDCl_3): 4,50 (2H, дкв, $^3\text{JCH}_2, \text{CH}_3$ 7,2, $^4\text{JCH}_2, \text{P}$ 1,1, CH_2 (Et)), 1,37 (3H, дт, $^3\text{JCH}_3, \text{CH}_2$ 7,2, $^5\text{JCH}_3, \text{P}$ 2,5, CH_3 (Et)). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 10,14 (с).

5'-(Этоксикарбонилфосфонат)-3'-азидо-3'-дезокситимидин (111a).

Метод А.

Охлажденный до 4°C раствор дихлорангидрида этоксикарбонилфосфоновой кислоты (0,230 мл, 0,015 моль) в триэтилфосфате (2 мл) перемешивали 30 минут, затем добавили 3'-азидо-3'-дезокситимидин (0,2 г; 0,75 ммоль) и оставили перемешиваться на ночь при 4°C. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Затем добавляли водный раствор NaHCO_3 . ТСХ в системе (А), затем в системе (В). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде (0 → 0,1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Выход соединения **111a** составил 10% в расчете на AZT.

Метод Б.

К охлажденному до 4°C дихлорангидриду этоксикарбонилфосфоновой кислоты (0,230 мл, 0,015 моль) добавляли по каплям ДМФА, перемешивали 30 минут при температуре 4°C, затем добавили AZT (0,2 г; 0,75 ммоль) и оставили перемешиваться на ночь при 4°C. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Затем добавляли NaHCO_3 в H_2O . Контроль система (А), затем система (Б). Раствор упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде (0 → 0,1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Получили соединение **111a** с выходом 18,6% в расчете на AZT.

Метод В.

К 3'-азидо-3'-дезокситимидину (0,2 г; 0,75 ммоль) добавили имидазол (0,41 г, 0,006 моль), ацетонитрил (20 мл, 0,006 моль) и перемешивали до полного растворения осадка. Полученный раствор перемешивали 15 минут при 4°C. Затем добавили дихлорангидрид этоксикарбонилфосфоновой кислоты (0,23 мл, 1,5 ммоль), еще через 30 минут добавили пиридин (1 мл), воду (1 мл) и оставили перемешиваться на 18 часов при 4°C. Реакционную

смесь сконцентрировали в вакууме и добавили NaHCO_3 в H_2O . Контроль ТСХ – система (А) затем система (В). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде (0 → 0,1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Получили соединение **111a** с выходом 16% в расчете на AZT.

Метод Г.

К раствору триэтилфосфоформата (10 мл, 53,3 ммоль) в CCl_4 (10 мл) при 0°C прикапывали триметилбромсилан (20,67 мл, 160 ммоль) и выдерживали 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали. К остатку, содержащему бистриметилсилильный эфир этоксикарбонилфосфоновой кислоты, при температуре 0°C добавили тионилхлорид (7,7 мл, 106,6 ммоль) и перемешивали 18 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь, содержащую хлорангидрид триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты, упаривали, охлаждали до -4°C и добавляли по каплям диметилформамид при перемешивании в течение 10 минут. Затем добавляли AZT (0,2 г 0,75 ммоль), перемешивали 4 ч. при температуре 4°C и оставляли на 18 ч. при температуре 4°C. Контроль ТСХ – система (В). Получили с выходом 13% в расчете на AZT.

111a: ^1H -ЯМР (DMSO-d_6): 7,80 (1H, с, H6), 6,13 (1H, т, J 6,6, H1'), 4,48 (1H, м, H3'), 4,02 (2H, кв, $^3\text{JCH}_3, \text{CH}_2$ 7,2, CH2 (Et)), 3,97 (3H, м, H4', H5'), 2,51 – 2,23 (2H, м, H2'). 1,79 (3H, с, 5-CH₃), 1,18 (3H, т, J 7,1, CH₃ (Et)). ^{31}P -ЯМР (DMSO-d_6): -4,54 (с). УФ спектр (H_2O): 266,80 нм (ϵ 9700)

Бистриметилсилильный эфир этоксикарбонилфосфоновой кислоты.

Метод А.

К бис-(триметилсилил)фосфиту (7,75 г; 0,03 моль) добавили триметилхлорсилан (8,7 мл; 0,685 моль) и этилхлорформат (4,9 мл; 0,05 моль). Нагревали реакционную массу до 90-100°C в течение 36 часов. Выход продукта составил 23,4%. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 4,24 (2H, дкв, $^3\text{JCH}_2, \text{CH}_3$ 7,2, $^4\text{JCH}_2, \text{P}$ 1,2, 2(Et)), 1,30 (3H, дт, $^3\text{JCH}_3, \text{CH}_2$ 7,2, $^5\text{JCH}_3, \text{P}$ 1,4, CH₃ (Et)), 0,29 (18H, с, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -25,28 (с).

Метод Б.

К триэтилфосфоформату (3 мл; 0,016 моль) добавили триметилхлорсилан (20,4 мл; 0,16 моль). Реакционную массу нагревали в течение 4 часов. По данным ЯМР целевой продукт не был получен, наблюдались сигналы исходного триэтилфосфоформата.

Метод С.

К триэтилфосфоформиау (3 мл, 0,016 моль) добавляли триметилхлорсилан (20,4 мл; 0,16 моль) и калий йодистый (8,0 г; 0,05 моль). Полученный жёлтый раствор выдерживали при 100-110°C в течение 24 часов. Выход 16%.

Бистриметилсилильный эфир этоксикарбонилфосфоновой кислоты: ^1H -ЯМР(CDCl_3): 4,24 (2H, дкв, $^3\text{JCH}_2, \text{CH}_3$ 7,2, $^4\text{JCH}_2, \text{P}$ 1,2, 2(Et)), 1,30 (3H, дт, $^3\text{JCH}_3, \text{CH}_2$ 7,2, $^5\text{JCH}_3, \text{P}$ 1,4, CH_3 (Et)), 0,29 (18H, с, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -25,28 (с).

Бис-(триметилсилил)фосфит.

Гексаметилдисилазан (24,5 мл; 0,18 моль) охладили до +4°C и при непрерывном перемешивании в течение 1 часа добавляли (8,2 г; 0,1 моль) фосфористой кислоты. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной и затем нагревали при 100 - 110°C до полного растворения кристаллов и прекращения выделения аммиака. Избыток ГМДС отгоняли в вакууме, остаток перегоняли при 15 мм рт. ст., бис-(триметилсилил)фосфит собирали при 85-90°C. Выход 58,2%. ^1H -ЯМР(CDCl_3): 6,79 (1H, д, ^1J 699,6, H-P), 0,26 (18H, с, CH_3). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -15,96 (с).

Хлорангидрид этилового эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты.

К раствору триэтилфосфоформиау (10 мл, 0,05 моль) в CCl_4 (10 мл) добавляли пентахлорид фосфора (11,1 гр.; 0,05 моль), происходило разогревание реакционной смеси и выделение хлористого этила. Реакционную смесь оставляли на 18 часов при 37°C. Затем перегоняли при 4 мм рт. ст., собирая продукт при 94,5-98°C. Выход 29,56% (3,13 г). ^1H -ЯМР(CDCl_3): 4,31 (4H, м, CH_2 (EtOP) + CH_2 (EtOOC)), 1,36 (3H, т, ^4J 7, CH_3 (EtOP)), 1,24 (3H, дт, $^3\text{JCH}_3, \text{CH}_2$ 7,2, $^5\text{JCH}_3, \text{P}$ 1,4, CH_3 (EtOOC)), ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -3,29 (с).

Получение 5'-аминокарбонилфосфонат-3'-азидо-3'-дезокситимидина (127).**Метод А.**

5'-(Этоксикарбонилфосфонат)-3'-азидо-3'-дезокситимидин **111a** (1 ммоль), выдерживали 18 ч. при комнатной температуре в 32% водном растворе аммиака (20 мл). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде (0 \rightarrow 0,1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Контроль ТСХ – система (B). Выход продукта **127** составил 95%.

Метод Б.

К 5'-(этоксикарбонилфосфонат)-3'-азидо-3'-дезокситимидин **111a** (1 ммоль) добавляли охлажденный 32% водный аммиак и перемешивали в течение 4 ч. при температуре -10°C . До окончания аммонолиза выдерживали при температуре 4°C . Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде ($0 \rightarrow 0,1 \text{ M}$). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Целевые фракции упаривали досуха на роторном испарителе. Контроль ТСХ – система (В). Выход продукта **127** составил 91%.

Метод В.

К триэтилфосфоформату (10 мл, 0,05 моль) добавляли пентахлорид фосфора (11,1 г; 0,05 моль), с небольшим разогреванием реакционной смеси и выделением этилхлорида. Затем добавили триметилбромсилан (6,8 мл, 0,08 моль). Реакционную смесь оставляли на 18 часов при 37°C . Реакционную смесь, содержащую **хлорангидрид триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты** концентрировали в вакууме водоструйного насоса, остаток упаривали и переупаривали с CCl_4 ($2 \times 10 \text{ мл}$).

К раствору **хлорангидрида триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты** (0,45 мл, 2,25 ммоль) в CCl_4 добавили AZT (0,2 г, 0,75 ммоль), перемешивали 4 ч. при температуре 23°C и оставляли на 18 ч. при температуре 4°C . Реакционную массу сконцентрировали в вакууме, к полученному **111a** добавили 32% водный раствор аммиака (5 мл). Реакционную смесь выдерживали 18 ч. при комнатной температуре, а затем сконцентрировали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде ($0 \rightarrow 0,1 \text{ M}$). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) с LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Контроль ТСХ – система (Б). Общий выход **127** 1,1%. Выход на AZT 23,5%.

Метод Г.

В охлажденный до 4°C **дихлорангидрид этоксикарбонилфосфоновой кислоты** (0,23 мл, 0,015 моль) добавляли по каплям ДМФА, перемешивали 30 мин. при температуре 4°C добавили AZT (0,2 г; 0,75 ммоль), оставляли перемешиваться на ночь при 4°C .

Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Затем добавляли NaHCO_3 в H_2O . Контроль система (А), затем система (Б). Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH_4HCO_3 в воде ($0 \rightarrow 0,1 \text{ M}$). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) LiChroprep RP-8 и элюировали водой.

Контроль ТСХ – система (В). Получили 5'-(этоксикарбонилфосфонат)-3'-азидо-3'-дезокситимидин (**111a**) с выходом 18,6%.

К этоксикарбонилфосфонату **111a** добавляли охлажденный 32% водный аммиак и перемешивали в течение 4 ч. при температуре -10°C. До окончания аммонолиза выдерживали при температуре 4°C. Раствор упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 x 18 см) с DEAE-Toyopearl, элюировали в линейном градиенте NH₄HCО₃ в воде (0 → 0,1 М). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку (2 x 18 см) LiChroprep RP-8 и элюировали водой. Целевые фракции упаривали досуха на ротормном испарителе. Контроль ТСХ – система (В). Общий выход продукта **127** составил 5,2%. Выход, считая на AZT, 16,7%.

127: УФ спектр (H₂O): 266,80 нм (ε 9700). ¹H-ЯМР (ДМСО-d₆ + CDCl₃): 7,74 (1H, кв, J 1, H6), 7,13 (1H, д, J 28, NH₂, Ha), 7,07 (1H, с, NH₂, Hb), 6,10 (1H, дд, J 7,3, 6,4, H1'), 4,48 (1H, м, H3'), 3,97 (3H, м, H4', H5'), 2,35 (1H, м, H2', Ha), 2,19 (1H, м, H2', H6), 1,78 (3H, д, J 1, 5-CH₃). ³¹P-ЯМР без подавления Р–Н взаимодействия (ДМСО-d₆ + CDCl₃): -0,65 (d, JP, NHa 26,7). ¹³C-ЯМР (ДМСО-d₆): 176,3 (д, ¹J_{C,P} 203,3, C(O)P), 164,1 (с, C-4), 150,7 (с, C-2), 136,3 (с, C-6), 110,3 (с, C-5), 83,7 (с, C-1'), 83,0 (д, ³J_{C,P} 6,7, C-4'), 64,7 (д, ²J_{C,P} 5,4, C-5'), 61,1 (с, C-3'), 36,4 (с, C-2'), 12,2 (с, 5-CH₃).

3.2.6. Доклинические испытания на животных моделях.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с протоколами Директивы Совета 86/609 / ЕЕС от 24 ноября 1986 г. о защите животных, используемых в экспериментальных целях. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием программы Thermo Kinetika 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Фармакокинетику после перорального приема изучали с помощью внесосудистой некомпартментной модели программы Thermo Kinetika (Thermo Fisher Scientific).

Фармакокинетика у собак.

Исследования соединений **127**, **129**, **138** и **139** проводили по стандартным протоколам на беспородных собаках (кобели и суки, 13,6 ± 2,6 кг массы тела). Тестируемые соединения вводили перорально натошак; животных кормили через 3 часа после введения дозы (50 или 20 мг / кг массы тела). Внутривенное введение (1–5 мл водного раствора, 5 мг / кг) проводили в переднюю вену стопы (*v. Cephalica antebrachii*) в течение 2–5 мин. Десять образцов крови (не менее 3 мл) были взяты из бедренной вены через 0–24 ч после введения и помещены в пробирки с гепарином (5 μл, 5000 Ед / мл) и центрифугированы в

течение 10 мин при 1500 g. Образцы плазмы хранили при -24°C. К надосадочной жидкости (0,25 мл) добавляли метанол (0,5 мл), смесь встряхивали в течение 30 с и снова центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g. Супернатант упаривали в вакууме при 40°C. Сухой остаток растворяли в воде и анализировали в условиях, указанных в разделе «Химическая стабильность» (стр. 207). Биодоступность (F) у собак рассчитывалась по следующей формуле: $F (AUC_{p.o. Di.v.}) / (AUC_{i.v. Dp.o.}) 100\%$, где Di.v. доза для внутривенного введения собакам; Dp.o. пероральная доза для собак; AUC_{i.v.} площадь под кривой время-концентрация для внутривенной дозы; и AUC_{p.o.} площадь под кривой время-концентрация для пероральной дозы.

Фармакокинетика у кроликов.

Кролики шиншиллы (самцы, $3 \pm 0,5$ кг) содержались в отдельных клетках со свободным доступом к воде и корму и 12-часовым освещением. Животные не получали корм за 14 ч до эксперимента и получали корм через 6 ч после введения исследуемых соединений. В случае однократного внутрижелудочного введения животных анестезировали смесью эфир / галотан 10:1 и вводили полиуретановый желудочно-кишечный зонд на глубину 15 см. Тестируемые соединения вводили в виде водных растворов (12 мл) в концентрации 7 или 70 мг / кг массы тела. В случае внутривенного введения (10 мг / кг массы тела) соединения вводили в вену *Auricularis marginalis* в физиологическом растворе (1 мл) в течение 1 мин; время закачки составляло 1 мин. В течение всего эксперимента каждому кролику ежедневно вводили однократную дозу гепарина (0,5 мл водного раствора, 5000 Ед / мл) перед взятием образцов крови. Образцы крови (в среднем 1 мл) отбирали из вены *Auricularis marginalis* в микропробирки, содержащие 5 μ л гепарина (5000 Ед / мл). Пробирки встряхивали, отбирали аликвоты по 0,5 мл и смешивали с метанолом (1 мл), быстро охлаждали в жидком азоте и хранили при -24°C. К надосадочной жидкости (0,25 мл) добавляли метанол (0,5 мл), смесь встряхивали в течение 30 с и снова центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g. Супернатант упаривали при 40°C. Сухой остаток растворяли в воде и анализировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Gilson на колонке Nucleosil 100 (Macherey-Nagel) C-18 (4150 мм). Хроматографические условия были следующими: раствор А, 50 мМ ацетат триэтиламмония; раствор В, 75% метанол; градиент В: 0 мин при 0% В, 12 мин при 10% В, 50 мин при 20% В и 55 мин при 100% В. Скорость потока составляла 0,5 мл / мин. Время удерживания: 32 мин для AZT-Н-фосфоната, 37 мин для соединения **127** и 51 мин для AZT.

Острая токсичность.

Значения LD₁₆, LD₅₀ и LD₈₄ получали по стандартной методике. Мышам BALB / с (самцы и самки, 19 ± 1 г веса тела) вводили однократные внутрибрюшинные дозы тестируемых соединений, растворенных в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Контрольным животным вводили соответствующий объем изотонического раствора хлорида натрия. Животных обследовали 14 дней. Мыши BALB / с были получены из инкубатория лабораторных животных Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в клетках Т-3 при искусственном освещении (свет и темнота, по 12 часов), принудительной вентиляции 12 раз / час, при температуре от 20 до 22°C и относительной влажности от 50 до 65%, на циновках из древесной стружки. Животные имели свободный доступ к воде и пище. Образцы крови мышей, убитых после введения соединения **127** в дозе 6 г / кг, немедленно обрабатывали и анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано в разделе «Фармакокинетика у кроликов».

Кумулятивный эффект.

Эксперименты по кумулятивному действию фосфоната **127** проводили на мышах линии BALB / с (самцы, 17 ± 1 г м.т.) по стандартной схеме (см. таблицу 26). Эффект оценивали на основе коэффициента кумуляции Сс, который рассчитывали следующим образом: $Cc = LD_{50n} / LD_{50\ 1}$, где LD_{50n} - средняя летальная доза после n-кратного введения, LD_{50 1} - средняя летальная доза после однократного введения (см. Острая токсичность). Сс > 1, привыкание; Сс < 1, кумуляция.

Таблица 26. Схема оценки кумулятивного действия препарата

| Дни | Число животных | Доза |
|-------|----------------|--------------------------------------|
| 1-4 | 10 | 0.1 LD ₅₀ – 536.5 мг/кг |
| 5-8 | 10 | 0.15 LD ₅₀ – 804.8 мг/кг |
| 9-12 | 10 | 0.22 LD ₅₀ – 1180.3 мг/кг |
| 13-16 | 10 | 0.34 LD ₅₀ – 1824.1 мг/кг |
| 17-20 | 10-9 | 0.5 LD ₅₀ – 2682.5 мг/кг |
| 21-24 | 9 | 0.75 LD ₅₀ – 2023.8 мг/кг |
| 25-28 | 9-8 | 1.12 LD ₅₀ – 6008.8 мг/кг |

Статистический анализ.

Статистическая значимость сравнений между группами лечения оценивалась с помощью двустороннего критерия Стьюдента. Значения выражены как среднее стандартное отклонение. Каждый фармакокинетический эксперимент повторяли не менее трех раз. Фармакокинетические параметры определяли с помощью программы Thermo Kinetika 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific). Нижний предел обнаружения AZT и амида **127** с использованием УФ-детекции (ϵ_{267} 9700) составлял 10 нмоль.

3.3. Методики к разделу 2.3.

3.3.1. *O*-(*L*-2',3'-Дидезокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат (**140**)

3.3.1.1. Синтез гетеродимера **140**

2',3'-Дидезокси-3'-тиацитидин-5'-(аминокарбонил)фосфонат (141**)** получали в две стадии с выделением промежуточного **2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин-5'-(этоксикарбонил)фосфоната**. К раствору бис(пиридиниевой) соли этоксикарбонилфосфоновой кислоты (203 мг, 0,65 ммоль) в пиридине (5 мл) прибавляли **2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин** (115 мг, 0,5 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (436 мг, 2 ммоль). Реакционную массу перемешивали 18 ч при комнатной температуре, а затем разбавили водой до 100 мл и отфильтровали выпавший осадок. Фильтрат нанесли на колонку с DEAE-Toyopearl; элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0,15 М). Целевые фракции упаривали переупаривали с водой (3 x 5 мл), остаток разбавляли водой (3 мл) и наносили на колонку с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Целевую фракцию лиофилизировали и получили **2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин-5'-этоксикарбонилфосфонат** с выходом 83% (152 мг). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.16 (1H, д, $J = 7.8$ Гц, H-6), 6.32 (1H, д, $J = 4.4$ и 4.6 Гц, H-1'), 6.12 (1H, д, $J = 7.8$ Гц, H-5), 5.47 (1H, м, H-4'), 4.42-4.31 (2H, м, H-5'), 4.10 (2H, м, CH_2CH_3) 3.58 (1H, м, H-2'а), 3.25 (1H, м, H-2'б), 1,13 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР с подавлением Р-Н взаимодействия (D_2O): -5.02 с.

К **2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин-5'-этоксикарбонилфосфонату** (140 мг, 0,38 ммоль) добавили раствор 25% водного аммиака (5 мл), раствор перемешивали 12 ч при температуре +4°C, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в воде и

хроматографировали на DEAE-Toyopearl (HCO_3^-), элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0,2 М), целевой продукт элюировали 0,12 М NH_4HCO_3 . Целевые фракции упаривали и переупаривали с водой (3 x 5 мл), остаток разбавляли водой (3 мл) и наносили на колонку с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Целевую фракцию лиофилизировали, получали 121 мг (71%) 5'-аминокарбонилфосфоната 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина. ^1H -ЯМР (D_2O): 8.14 (1H, д, $J = 7.8$ Гц, H-6), 6.30 (1H, д, $J = 4.4$ и 4.6 Гц, H-1'), 6.11 (1H, д, $J = 7.8$ Гц, H-5), 5.44 (1H, м, H-4'), 4.36 (1H, м, H-5'a), 4.23 (1H, м, H-5'b), 3.56 (1H, м, H-2'a), 3.24 (1H, м, H-2'b). ^{31}P -ЯМР с подавлением Р-Н взаимодействия (D_2O): -1.65 с.

***O*-(L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин-5'-ил)-*O'*-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил)аминокарбонилфосфонат (140).** К смеси **141** (410 мг, 1 ммоль) и AZT (347 мг, 1.3 ммоль) соупаривали с пиридином (2 x 5 мл) в вакууме, в третий раз добавили 10 мл пиридина и упарили до объема 5 мл. Затем добавили TPSCl (1030 мг, 3.4 ммоль), после чего пожелтевший раствор оставили перемешиваться на 72 часа при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ на силикагеле, элюировали смесью этилацетат: хлороформ: метанол: вода / 3:4.5:1.5:0.25 плюс 0.2% уксусной кислоты. Разделение реакционной смеси проводили колоночной хроматографией на силикагеле, элюент тот же. Далее продукт упаривали с добавлением уксусной кислоты в качестве стабилизатора. Выход продукта **140** составил 55% (321 мг). ^1H -ЯМР (DMSO-d_6): 11.30 (2H, с, NH_2), 7.69 (1H, м, H-6 (3TC)), 7.47 и 7.46 (1H, 2с, H-6 (AZT)), 6.24 (1H, т, $J = 5.6$ Гц, H-1' (3TC)), 6.13 (2H, т, $J = 6.6$ Гц, H-1' (AZT)), 5.76 (1H, д, $J = 7.4$ Гц, H-5 (3TC)), 5.38 (1H, мм, H-4' (3TC)), 4.49 (1H, м, H-3' (AZT)), 4.38-4.30 (4H, м, H-5' (AZT) и H-5' (3TC)), 4.04 (1H, м, H-4' (AZT)), 3.41-3.37 и 3.08-3.03 (2H, 2 м, H-2' (3TC)), 2.39-2.34 (2H, м, H-2' (AZT)), 1.78 (3H, 2с, 5- CH_3). ^{13}C -ЯМР (DMSO-d_6): 165.53, 165.06, 163.56, 154.59, 150.30, 140.57, 135.72, 110.08, 94.44, 87.17, 83.70, 81.31, 81.08, 67.75, 66.05, 60.02, 35.64, 35.28, 11.99. ^{31}P -ЯМР (DMSO-d_6): 1.94с и 2.276с. HRESIMS m/z : вычислено $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{O}_9\text{PS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 586.1228, найдено 586.1220.

3.3.1.2. Оценка стабильности гетеродимера 140

Химическую стабильность соединения **140** определяли при различных значениях pH: 2,2 (глицин-HCl), 5,15, 6,2 (натрий-фосфатный буфер) и 8,6 (трис-HCl). Реакционную смесь (75 мкл), содержащую 25 мМ гетеродимера **140** (3 мкл) в ДМСО и буферный раствор (72 мкл), инкубировали при 37°C. Аликвоты (15 мкл) отбирали через определенные промежутки времени (0, 15, 30 мин, 1, 2, 6, 18, 24 ч). Реакцию останавливали

замораживанием в жидком азоте. Степень гидролиза оценивали методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом (условия I) и псевдо ион-парном (условия II) режимах. ВЭЖХ выполняли на хроматографе Gilson 311 с насосом Model 306 и детектором 2158 UV / VIS-151 (Gilson Corp., Франция) с использованием колонки LiChrosorb RP-18 (5 мкм, 4x150 мм) и предколонки C-18 (40 мкм, 4x5 мм) (Merck, Германия). Результаты оценивались с помощью 712 System Gilson Controller Software, Gilson Corp. Для оценки химической стабильности гетеродимер **140** и продукты его гидролиза элюировали в следующих условиях: (I): градиент 80% EtOH в 5-мМ натрий-фосфатном буфере (pH 5,15): 0%, 5 мин; 0-15%, 10 мин; 15-30%, 10 мин; 30→50%, 15 мин; 50→70%, 5 мин; 70→100%, 5 мин; скорость элюирования 0,4 мл / мин, детектирование при $\lambda = 264$ нм. Время удерживания: 3ТС, 14 мин; AZT, 20 мин; 3ТС 5'-аминокарбонилфосфонат (**141**), 13 мин; 5'-аминокарбонилфосфонат AZT (**127**), 15 мин; гетеродимер (**140**), 22 мин. (II): градиент 80% EtOH в 0,1% гептафтормасляной кислоте (pH 3): 0%, 5 мин; 0→15%, 20 мин; 15-40%, 13 мин; 40→100%, 7 мин; скорость элюирования 0,4 мл / мин, детектирование при $\lambda = 264$ нм. Время удерживания: 3ТС, 31 мин; AZT, 33 мин; 3ТС 5'-аминокарбонилфосфонат (**141**), 18 мин; 5'-аминокарбонилфосфонат AZT (**127**), 20 мин; гетеродимер (**140**), 40 мин.

3.3.1.3. Методики исследования биологических свойств гетеродимера **140**

Изучение токсичности и антивирусной активности гетеродимера **140** в культуре клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, проводили в институте вирусологии им. Ивановского. Методика опубликована[326].

Исследование анти-ВИЧ активности и токсичности гетеродимера **140** в лимфоидной ткани человека *ex vivo* было проведено в лаборатории Л.Б Марголиса (Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Методики опубликованы[326].

3.3.2. Комбинированные антивирусные агенты против ВИЧ и HCMV

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

Общий метод синтеза (3'-азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[ω-(4-бромфенокси) алкил]-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(6H)-ил]ацетатов (**142a-f**). К смеси соответствующей [3-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусной кислоты **145a-f** (0,4 ммоль) и AZT (0,4 ммоль, 107 мг) в сухом пиридине (5

мл) добавляли 1,3-дициклогексилкарбодиимид (0,48 ммоль, 99 мг) и оставляли на 24 часа при перемешивании. Растворители удаляли в вакууме, остаток делили методом PLC на силикагеле в смеси CHCl_3 :MeOH (96:4). Целевые продукты дочищали методом PLC на силикагеле в смеси этилацетат: CHCl_3 (3: 2) с добавлением 1% метанола.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[3-(4-бромфенокси)пропил]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142a) получили в виде желтоватого масла, выход 61% (154 мг). R_f 0.30 (CHCl_3 -MeOH (95:5)). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 1.92 (3H, с, CH_3 , Thy), 2.16-2.19 (2H, м, CH_2), 2.39-2.45 (2H, м, $2'\text{CH}_2$, Azt), 3.95-3.98 (4H, м, NCH_2 , OCH_2), 4.01-4.03 (1H, м, $4'\text{CH}$, Azt), 4.24-4.26 (1H, м, $3'\text{CH}$, Azt), 4.39-4.52 (2H, м, $5'\text{H}$ -2, Azt), 4.59-4.84 (2H, м, CH_2CO), 5.73-5.75 (1H, д, $J = 7.9$ Гц, H-5, Ura), 6.08-6.11 (1H, т, $J = 8$ Гц, $1'\text{CH}$, Azt), 6.73-6.76 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.17-7.19 (1H, д, $J = 8$ Гц, H-6, Ura), 7.24 (1H, с, H-6, Thy), 7.36-7.38 (2H, м, H-2', H-6', Ph), 8.48 (1H, с, NH). ^{13}C -ЯМР (100.6 МГц, CDCl_3), δ м.д.: 12.63, 28.23, 37.54, 41.96, 47.61, 60.20, 63.65, 64.58, 81.90, 85.37, 101.43, 111.49, 113.60, 116.27 \times 2, 132.56 \times 2, 135.56, 143.57, 150.04, 151.25, 157.47, 162.36, 163.43, 167.65. HRMS: m/z [M + H] $^+$ вычислено $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrN}_7\text{O}_8$: 632.1099, найдено: 632.1093.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[5-(4-бромфенокси)пентил]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142b) получили в виде желтого масла, выход 74% (195 мг, 0.30 ммоль). R_f 0.31 (CHCl_3 -MeOH (95:5)). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 1.48-1.52 (2H, м, CH_2), 1.76-1.80 (4H, м, 2CH_2), 1.92 (3H, с, CH_3 , Thy), 2.35-2.44 (2H, м, $2'\text{CH}_2$, Azt), 3.74 -3.78 (2H, т, $J = 8$ Гц, NCH_2), 3.89-3.92 (2H, м, OCH_2), 4.01-4.02 (1H, м, $4'\text{CH}$, Azt), 4.23-4.25 (1H, м, $3'\text{CH}$, Azt), 4.41-4.49 (2H, м, $5'\text{CH}_2$, Azt), 4.61-4.84 (2H, м, CH_2CO), 5.76-5.78 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.08-6.12 (1H, т, $1'\text{CH}$, Azt), 6.73-6.75 (2H, м, 2CH , H-3', H-5', Ph), 7.16- 7.18 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-6, Ura), 7.25 (1H, с, H-6, Thy), 7.32-7.35 (2H, м, 2CH_2 , H-2', H-6', Ph), 8.86 (1H, с, NH). ^{13}C -ЯМР (100.6 МГц, CDCl_3), δ м.д.: 12.57, 23.05, 28.68, 28.74, 37.47, 41.96, 49.85, 60.18, 63.63, 67.67, 81.82, 85.24, 101.42, 111.44, 112.88, 116.32 \times 2, 132.30 \times 2, 135.49, 143.05, 150.11, 151.17, 158.05, 162.34, 163.59, 167.62. HRMS: m/z [M + H] $^+$ вычислено $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BrN}_7\text{O}_8$: 660.1413, найдено: 660.1412.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[6-(4-бромфенокси)гексил]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142c) получили в виде желтого масла, выход 60% (162 мг, 0.24 ммоль). R_f 0.31 (CHCl_3 -MeOH (95:5)). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 1.37-1.41 (2H, м, CH_2), 1.47-1.52 (2H, м, CH_2), 1.70-1.78 (4H, м, 2CH_2), 1.93 (3H, с, CH_3 , Thy), 2.35-2.44 (2H, м, $2'\text{CH}_2$, Azt), 3.73 - 3.76 (2H, т, $J = 8$ Гц, NCH_2), 3.89-3.39 (2H, м, OCH_2), 4.00-4.04 (1H, м, $4'\text{CH}$, Azt), 4.22-4.26 (1H, м, $3'\text{CH}$, Azt), 4.38-4.52 (2H, м, $5'\text{CH}_2$, Azt), 4.61-4.85 (2H, м, CH_2CO), 5.75-5.77 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.08-6.12 (1H, т, $J = 8$ Гц, $1'\text{CH}$,

Azt), 6.73-6.76 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.15-7.17 (1H, d, H-6, $J = 8$ Гц, Ura), 7.26 (1H, с, 6CH, Thy), 7.32-7.35 (2H, м, 2CH₂, H-2', H-6', Ph), 8.40 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (100.6 МГц, CDCl₃), δ , м.д.: 12.62, 25.69, 26.20, 29.02×2, 37.54, 42.01, 49.95, 60.22, 63.64, 67.94, 81.90, 85.25, 101.45, 111.50, 112.84, 116.38×2, 132.34×2, 135.48, 143.07, 150.02, 151.22, 158.19, 162.38, 163.38, 167.67. HRMS: $m/z[M + H]^+$ вычислено C₂₈H₃₂BrN₇O₈: 674.1568, найдено: 674.1563.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[8-(4-бромфенокси)октил]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142d) получили в виде желтого масла, выход 66% (185 мг, 0.26 ммоль). R_f 0.32 (CHCl₃-MeOH (95:5)). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.34-1.43 (8H, м, 4CH₂), 1.67-1.76 (4H, м, 2CH₂), 1.93 (3H, с, CH₃, Thy), 2.33-2.44 (2H, м, 2'CH₂, Azt), 3.73 (2H, т, $J = 7.4$ Гц, NCH₂), 3.88-3.91 (2H, м, OCH₂), 4.01-4.02 (1H, м, 4'CH, Azt), 4.24-4.25 (1H, м, 3'CH, Azt), 4.38-4.42 (2H, м, 5'CH₂, Azt), 4.49-4.85 (2H, м, CH₂CO), 5.76-5.78 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.10-6.12 (1H, т, 1'CH, Azt), 6.73-6.77 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.16-7.17 (1H, д, H-6, $J = 6$ Гц, Ura), 7.27 (1H, с, 6CH, Thy), 7.32-7.36 (2H, м, H-2', H-6', Ph), 8.56 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (100.6 МГц, CDCl₃), δ , м.д.: 12.56, 25.89, 26.35, 28.99, 29.05, 29.11, 29.13, 37.46, 41.97, 50.01, 60.20, 63.66, 68.18, 81.80, 85.14, 101.29, 111.45, 112.64, 116.37×2, 132.23×2, 135.46, 143.14, 150.23, 151.15, 158.25, 162.40, 163.76, 167.64. HRMS: $m/z[M + H]^+$ вычислено C₃₀H₃₆BrN₇O₈: 702.1881, найдено: 702.1872.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[10-(4-бромфенокси)децил]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142e) получили в виде желтого масла, выход 57% (166 мг, 0.23 ммоль). R_f 0.32 (CHCl₃-MeOH (95:5)). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.25-1.41 (12H, м, 6CH₂), 1.67-1.75 (4H, м, 2CH₂), 1.92 (3H, с, CH₃, Thy), 2.35-2.44 (2H, м, 2'CH₂, Azt), 3.72 - 3.74 (2H, м, NCH₂), 3.87-3.90 (2H, м, OCH₂), 4.02 (1H, м, 4'CH, Azt), 4.22-4.24 (1H, м, 3'CH, Azt), 4.38-4.52 (2H, м, 5'CH₂, Azt), 4.61-4.84 (2H, м, CH₂CO), 5.76-5.78 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.12 (1H, т, 1'CH, Azt), 6.73-6.75 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.16-7.18 (1H, д, H-6, $J = 6$ Гц, Ura), 7.27 (1H, с, 6CH, Thy), 7.32-7.34 (2H, м, H-2', H-6', Ph), 9.05 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (100.6 МГц, CDCl₃), δ , м.д.: 12.73, 26.02, 26.50, 29.10, 29.19, 29.21, 29.33, 29.40, 29.45, 37.62, 42.08, 50.14, 60.28, 63.72, 68.33, 81.87, 85.18, 101.42, 111.55, 112.65, 116.42×2, 132.27×2, 135.53, 143.29, 150.26, 151.20, 158.33, 162.46, 163.75, 167.69. HRMS: $m/z[M + H]^+$ вычислено C₃₂H₄₀BrN₇O₈: 730.2194, найдено: 730.2190.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[12-(4-бромфенокси)додecil]-2,6-диоксо-3,6-

дигидропиримидин-1(6Н)-ил]ацетат (142f) получили в виде желтого масла, выход 58% (176 мг, 0.23 ммоль). R_f 0.33 (CHCl₃-MeOH (95:5)). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.24-1.41 (16H, м, 8CH₂), 1.72-1.75 (4H, м, 2CH₂) 1.92 (3H, с, CH₃, Thy), 2.34-2.43 (2H, м, 2'CH₂, Azt), 3.71 (2H, т, $J = 7.5$ Гц, NCH₂), 3.89 (2H, т, $J = 6$ Гц, OCH₂), 4.01-4.02 (1H, м, 4'CH,

Azt), 4.23-4.25 (1H, м, 3'CH, Azt), 4.37-4.53 (2H, м, 5'CH₂, Azt), 4.61-4.84 (2H, м, CH₂CO), 5.76 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.12 (1H, т, $J = 6$ Гц, 1'CH, Azt), 6.73-6.76 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.16 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-6, Ura), 7.26 (1H, с, 6CH, Thy), 7.31-7.35 (2H, м, H-2', H-6', Ph), 8.97 (1H, с, NH). ¹³C-ЯМР (100.6 МГц, CDCl₃), δ , м.д.: 12.60, 26.04, 26.49, 29.07, 29.22 \times 2, 29.39, 29.47, 29.54 \times 3, 37.51, 42.01, 50.01, 60.23, 63.67, 68.35, 81.86, 85.13, 101.30, 111.52, 112.63, 116.42 \times 2, 132.26 \times 2, 135.44, 143.17, 150.22, 151.19, 158.34, 162.44, 163.68, 167.68. HRMS: m/z [M + H]⁺ вычислено C₃₄H₄₄BrN₇O₈: 758.2507, найдено: 758.2507.

((-)-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин)-2-[3-[6-(4-бромфенокси)гексил]-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(6H)-ил]ацетат (143) получили в виде желтого масла, выход 30% (27 мг, 0.04 ммоль). R_f 0.5 (CHCl₃-MeOH (95:5)). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.36-1.43 (2H, м, CH₂), 1.47-1.55 (2H, м, CH₂) 1.72-1.79 (4H, м, 2CH₂), 3.01-3.07 (1H, м, 2'CH₂, 3TC), 3.49-3.55 (1H, м, 2'CH₂, 3TC), 3.73-3.78 (2H, т, $J = 8$ Гц, NCH₂), 3.89-3.93 (2H, т, OCH₂), 4.44-4.56 (2H, м, 5'CH₂, 3TC), 4.69-4.82 (2H, м, CH₂CO), 5.33-5.36 (1H, м, 4'CH₂, 3TC), 5.76-5.79 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, 3TC), 5.93-5.96 (1H, д, $J = 6$ Гц, H-5, Ura), 6.30-6.34 (1H, т, $J = 8$ Гц, 1'CH, 3TC), 6.73-6.79 (2H, м, H-3', H-5', Ph), 7.20-7.22 (1H, д, H-6, $J = 8$ Гц, Ura), 7.33-7.38 (2H, м, 2CH₂, H-2', H-6', Ph), 7.63-7.65 (1H, д, H-6, $J = 8$ Гц, 3TC). ¹³C-ЯМР (100.6 МГц, CDCl₃), δ , м.д.: 25.6, 26.1, 28.9 \times 2, 37.6, 41.8, 49.8, 65.3, 67.9, 82.1, 87.7, 95.2, 101.3, 112.7, 116.3 \times 2, 132.2 \times 2, 140.6, 143.1, 151.1, 155.4, 158.1, 162.4, 165.7, 167.5. HRMS: m/z [M + H]⁺ вычислено C₂₆H₃₀BrN₅O₇S: 636.1122, найдено: 636.1127.

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

Стабильность гетеродимеров к действию гидролизующих ферментов анализировали на примере соединений **142b-d** и **143**. В 30 мкл 50 мМ трис-HCl буфера pH 8,2, содержащего 250 мМ NaCl, 6 мМ CaCl₂, 5.2 ед./тест эстеразы из печени свиньи, добавляли различные концентрации тестируемых соединений (2-10 мМ) в метаноле. Реакции проводили при 37°C в течение 0-18 ч. Продукты реакции разделяли методом ТСХ в смеси хлороформ-этанол 32:1 для соединений **142b** и **142d** или хлороформ-метанол 95: 5 для соединений **142c** и **143**. Соединения **144b-d**, **145b-d**, AZT и 3TC использовали в качестве контролей. R_f продуктов гидролиза: **142b** - 0,72, **145b** - 0,31, **144b** - 0,72, **142c** - 0,69, **145c** - 0,03, **144c** - 0,44, **143** - 0,50, 3TC - 0,30, **142d** - 0,80, **145d** - 0,38, **144d** - 0,60, AZT - 0,51. Продукты идентифицировали масс-спектрометрией. Время удерживания: AZT – 3.4 мин, **145b** – 4.1

мин, **145c** – 4.3 мин, **145d** – 4.7 мин, **142b** – 6.3 мин, **142c** – 6.5 мин, **142d** – 7.1 мин. Время удерживания для **143** составляло 7.5 мин, элюирование в градиенте метанола.

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

Предварительную оценку активности конъюгатов **142a-f** против ЦМВ человека проводили в лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Методика опубликована[214].

Цитотоксичность и анти-ВИЧ активность соединений были проверены на культуре клеток MT-4 в лаборатории Л.Б Марголиса (Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Методика опубликована[214]. Оценку цитотоксичности гетеродимеров **142c** и **143** в системе тканей человека *ex vivo* на фрагментах ткани миндалин, культивированных в соответствии с разработанной ранее методикой[326, 330], проводили в лаборатории Л.Б Марголиса (Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Методика опубликована[214].

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 штамм 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 противовирусные компоненты под действием гидролизующих ферментов (эстераз); показано отсутствие цитотоксичности и наличие противовирусной активности в отношении ВИЧ и HCMV.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ac – ацетил

AdeH – аденин

AZT – 3'-дезоксизидотимидин

Bn – бензил

Bu – бутил

Bz – бензоил

BVDU – 5-(E)-(-2-бромвинил)-2'-дезоксидурин

Cbz – бензилоксикарбонил

CC₅₀ – концентрация вещества, в присутствии которой жизнеспособность клеток уменьшается на 50%

CytH – цитозин

d₄T – 2',3'-дезоксизидотимидин

dATP – 2'-дезоксиденозин 5'-трифосфат

DABCO – 1,4-диазабисцикло[2.2.2]октан

DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен

DEAE – диэтиламиноэтил

DIAD – диизопропилазодикарбонилат

DIPEA – N,N-диизопропилэтиламин

dGTP – 2'-дезоксигуанозин 5'-трифосфат

EBV – вирус Эпштейна-Барр

EC₅₀ – концентрация, необходимая для ингибирования активности вируса на 50%

ED₅₀ - это эффективная доза, концентрация вещества при которой происходит подавление вируса на 50%

EFV – эфавиренц

Et – этил

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США

GuaH – гуанин

HAdV – аденовирус человека

HBV – вирус гепатита В

HCMV – цитомегаловирус человека

HCV – вирус гепатита С

Hcy – гомоцистеин

HEPT – 1-(2-Гидроксиэтоксиметил)-6-(фенилтио)тимин

HMDS – гексаметилдисилазан

HRMS – масс-спектрометрия высокого разрешения

HSV-1, HSV-2 – вирус герпеса простой 1 и 2

HypH – гипоксантин

ID₅₀ – концентрация, необходимая для ингибирования активности фермента на 50%

IDU – 5-йод-2'-дезоксидин

IN – интеграз

*i*Pr – изопропил

LDA – диизопропиламид лития

m-CPBA – *мета*-хлорпербензойная кислота

Me – метил

MIC₅₀ – минимальная концентрация, необходимая для ингибирования вызванной вирусом цитопатичности на 50%

MIC₉₀ – минимальная концентрация, необходимая для ингибирования роста не менее 90% бактериальной популяции

MLV – вирус мышиной лейкемии

Ms – метансульфонил

NMP – N-метилпирролидон

Ph – фенил

RAFI – жесткие амфипатические ингибиторы слияния

RSV – респираторно-синцитиальный вирус

Pur – пури

Py – пиридин

SAH – S-аденозилгомоцистеин

SAM – S-аденозилметионин

SAR – закономерность структура – активность

SARS – CoV-2 - коронавирус 2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром

SATE – S-ацил-2-тиоэтил

SI – индекс селективности

t-Boc – *трет*бутилоксикарбонил

TBEV – вирус клещевого энцефалита

TBDMS – *трет*-бутилдиметилсилил

3TC – (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин

TD₅₀ – токсическая доза, концентрация вещества при которой погибает 50% клеток

TEAB – бикарбонат триэтиламония

ThyH – тимидин
 TFA –трифторуксусная кислота
 TMAD – *N,N,N',N'*- тетраметилязодикарбоксамид
 TPSCl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид
 Ts – *p*-толуолсульфонил
 TSAO-T – [1-[2',5'-бис-*O*-(*трет*-бутилдиметилсилил)- β -D-рибофуранозил]тимин]-3'-спиро-5''-(4''-амино-1'',2''-оксатиол-2'',2''-диоксид)
 UraH – урацил
 VV – вирус вакцины
 VZV – вирус варицелла-зостер
 АМФ – аденозинмонофосфат
 АТФ – аденозинтрифосфат
 ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия
 ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГМФТА – гексаметилфосфорамида
 ДМАП – *N,N*-диметил-4-аминопиридин
 ДМСО – диметилсульфоксид
 ДМФА – диметиформамид
 ДНК – 2'-дезоксирибонуклеиновая кислота
 ДЦК – *N,N*-дициклогексилкарбодиимид
 ДЭАД – диэтилазодикарбоксилат
 КДИ – *N,N'*-карбонилдиимидазол
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 НИОТ ВИЧ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека
 ННИОТ ВИЧ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека
 ННИ HCMV – ненуклеозидные ингибиторы цитомегаловируса человека
 ОТ ВИЧ – обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека
 РНКазы H – рибонуклеаза H
 СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
 ТГФ – тетрагидрофуран
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 УФ – ультрафиолетовая область

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

^1H -ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах ^1H

^{13}C -ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах ^{13}C

^{19}F -ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах ^{19}F

^{31}P -ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах ^{31}P

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matyugina E. S., Khandazhinskaya A. L. 5'-Norcarbocyclic nucleoside analogs // Russian Chemical Bulletin. – 2014. – Т. 63, № 5. – С. 1069-1080.
2. Matyugina E. S., Khandazhinskaya A. L., Kochetkov S. N. Carbocyclic nucleoside analogues: classification, target enzymes, mechanisms of action and synthesis // Russian Chemical Reviews. – 2012. – Т. 81, № 8. – С. 729-746.
3. 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.
4. Khandazhinskaya A. L., Shirokova E. A. AZT 5'-Phosphonates: Achievements and Trends in the Treatment and Prevention of HIV Infection // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 54-61.
5. https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2021-global-aids-update_en.pdf. –
6. Bruxelle J. F., Trattning N., Mureithi M. W., Landais E., Pantophlet R. HIV-1 Entry and Prospects for Protecting against Infection // Microorganisms. – 2021. – Т. 9, № 2.
7. Veenhuis R. T., Abreu C. M., Shirk E. N., Gama L., Clements J. E. HIV replication and latency in monocytes and macrophages // Semin Immunol. – 2021. – Т. 51. – С. 101472.
8. Krupkin M., Jackson L. N., Ha B., Puglisi E. V. Advances in understanding the initiation of HIV-1 reverse transcription // Curr Opin Struct Biol. – 2020. – Т. 65. – С. 175-183.
9. Gummuluru S., Emerman M. Advances in HIV molecular biology // AIDS. – 2002. – Т. 16 Suppl 4. – С. S17-23.
10. Pani A., Loi A. G., Mura M., Marceddu T., La Colla P., Marongiu M. E. Targeting HIV: old and new players // Curr Drug Targets Infect Disord. – 2002. – Т. 2, № 1. – С. 17-32.
11. Maeda K., Das D., Kobayakawa T., Tamamura H., Takeuchi H. Discovery and Development of Anti-HIV Therapeutic Agents: Progress Towards Improved HIV Medication // Curr Top Med Chem. – 2019. – Т. 19, № 18. – С. 1621-1649.
12. Balzarini J. Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 // Curr Top Med Chem. – 2004. – Т. 4, № 9. – С. 921-44.
13. Wassner C., Bradley N., Lee Y. A Review and Clinical Understanding of Tenofovir: Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Tenofovir Alafenamide // J Int Assoc Provid AIDS Care. – 2020. – Т. 19. – С. 2325958220919231.
14. Das K., Martinez S. E., Bauman J. D., Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism // Nat Struct Mol Biol. – 2012. – Т. 19, № 2. – С. 253-9.
15. Chen W., Zhan P., Wu J., Li Z., Liu X. The development of HEPT-type HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and its implications for DABO family // Curr Pharm Des. – 2012. – Т. 18, № 27. – С. 4165-86.
16. D'Cruz O. J., Uckun F. M. Novel tight binding PETT, HEPT and DABO-based non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // J Enzyme Inhib Med Chem. – 2006. – Т. 21, № 4. – С. 329-50.
17. Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., Ozerov A. A., Valuev-Elliston V. T., Temburnikar K., Gurskaya G. V., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2011. – Т. 19, № 19. – С. 5794-5802.
18. <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/fda-approved-hiv-medicines>. –

19. Ren J., Milton J., Weaver K. L., Short S. A., Stuart D. I., Stammers D. K. Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase // *Structure*. – 2000. – T. 8, № 10. – C. 1089-94.
20. Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases // *Nat Rev Drug Discov*. – 2013. – T. 12, № 6. – C. 447-64.
21. Seley-Radtke K. L., Yates M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold // *Antiviral Res*. – 2018. – T. 154. – C. 66-86.
22. Yates M. K., Seley-Radtke K. L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold // *Antiviral Res*. – 2019. – T. 162. – C. 5-21.
23. Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – T. 3, № 5. – C. 330-8.
24. Palasz A., Ciez D. In search of uracil derivatives as bioactive agents. Uracils and fused uracils: Synthesis, biological activity and applications // *Eur J Med Chem*. – 2015. – T. 97. – C. 582-611.
25. Thomson J. M., Lamont I. L. Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents // *Front Microbiol*. – 2019. – T. 10. – C. 952.
26. Ali J. A., Tagoe D. N., Munday J. C., Donachie A., Morrison L. J., de Koning H. P. Pyrimidine biosynthesis is not an essential function for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms // *PLoS One*. – 2013. – T. 8, № 3. – C. e58034.
27. Campagnaro G. D., de Koning H. P. Purine and pyrimidine transporters of pathogenic protozoa - conduits for therapeutic agents // *Med Res Rev*. – 2020. – T. 40, № 5. – C. 1679-1714.
28. De Clercq E. New Nucleoside Analogues for the Treatment of Hemorrhagic Fever Virus Infections // *Chem Asian J*. – 2019. – T. 14, № 22. – C. 3962-3968.
29. De Clercq E., Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years // *Clin Microbiol Rev*. – 2016. – T. 29, № 3. – C. 695-747.
30. Tyrrell D. A. Some Basic Ideas on the Inhibition of Virus Multiplication // *Trans Ophthalmol Soc U K*. – 1963. – T. 83. – C. 573-81.
31. Pomerantz R. J., Schooley R. T. Therapy of human immunodeficiency virus infections // *Clin Lab Med*. – 1987. – T. 7, № 4. – C. 793-813.
32. Balzarini J. Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives // *Pharm World Sci*. – 1994. – T. 16, № 2. – C. 113-26.
33. Schalm S. W., de Man R. A., Heijntink R. A., Niesters H. G. New nucleoside analogues for chronic hepatitis B // *J Hepatol*. – 1995. – T. 22, № 1 Suppl. – C. 52-6.
34. Sun S., Yang Q., Sheng Y., Fu Y., Sun C., Deng C. Investigational drugs with dual activity against HBV and HIV (Review) // *Exp Ther Med*. – 2021. – T. 21, № 1. – C. 35.
35. Richman D. D. Antiretroviral activity of emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor // *Antivir Ther*. – 2001. – T. 6, № 2. – C. 83-8.
36. Hirsch M. S., Schooley R. T. Drug therapy. Treatment of herpesvirus infections // *N Engl J Med*. – 1983. – T. 309, № 16. – C. 963-70.
37. Lea A. P., Bryson H. M. Cidofovir // *Drugs*. – 1996. – T. 52, № 2. – C. 225-230; discussion 231.

38. Famiglini V., Silvestri R. Focus on Chirality of HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors // *Molecules*. – 2016. – T. 21, № 2.
39. Song Y., Fang Z., Zhan P., Liu X. Recent advances in the discovery and development of novel HIV-1 NNRTI platforms (Part II): 2009-2013 update // *Curr Med Chem*. – 2014. – T. 21, № 3. – C. 329-55.
40. Zhan P., Liu X., Li Z. Recent advances in the discovery and development of novel HIV-1 NNRTI platforms: 2006-2008 update // *Curr Med Chem*. – 2009. – T. 16, № 22. – C. 2876-89.
41. Zhuang C., Pannecouque C., De Clercq E., Chen F. Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): our past twenty years // *Acta Pharm Sin B*. – 2020. – T. 10, № 6. – C. 961-978.
42. Miyasaka T., Tanaka H., Baba M., Hayakawa H., Walker R. T., Balzarini J., Declercq E. A Novel Lead for Specific Anti-Hiv-1 Agents - 1-[(2-Hydroxyethoxy)Methyl]-6-(Phenylthio)Thymine // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1989. – T. 32, № 12. – C. 2507-2509.
43. Baba M., Tanaka H., Declercq E., Pauwels R., Balzarini J., Schols D., Nakashima H., Perno C. F., Walker R. T., Miyasaka T. Highly Specific-Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 by a Novel 6-Substituted Acyclouridine Derivative // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1989. – T. 165, № 3. – C. 1375-1381.
44. Baba M., Declercq E., Tanaka H., Ubasawa M., Takashima H., Sekiya K., Nitta I., Umezu K., Nakashima H., Mori S., Shigeta S., Walker R. T., Miyasaka T. Potent and Selective-Inhibition of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 (Hiv-1) by 5-Ethyl-6-Phenylthiouracil Derivatives through Their Interaction with the Hiv-1 Reverse-Transcriptase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – T. 88, № 6. – C. 2356-2360.
45. Tanaka H., Baba M., Saito S., Miyasaka T., Takashima H., Sekiya K., Ubasawa M., Nitta I., Walker R. T., Nakashima H., Declercq E. Specific Anti-Hiv-1 Acyclonucleosides Which Cannot Be Phosphorylated - Synthesis of Some Deoxy Analogs of 1-[(2-Hydroxyethoxy)Methyl]-6-(Phenylthio)Thymine // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1991. – T. 34, № 4. – C. 1508-1511.
46. Tanaka H., Takashima H., Ubasawa M., Sekiya K., Nitta I., Baba M., Shigeta S., Walker R. T., Declercq E., Miyasaka T. Synthesis and Antiviral Activity of Deoxy Analogs of 1-[(2-Hydroxyethoxy)Methyl]-6-(Phenylthio)Thymine (Hept) as Potent and Selective Anti-Hiv-1 Agents // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1992. – T. 35, № 25. – C. 4713-4719.
47. Baba M., Declercq E., Tanaka H., Ubasawa M., Takashima H., Sekiya K., Nitta I., Umezu K., Walker R. T., Mori S., Ito M., Shigeta S., Miyasaka T. Highly Potent and Selective-Inhibition of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 by a Novel Series of 6-Substituted Acyclouridine Derivatives // *Molecular Pharmacology*. – 1991. – T. 39, № 6. – C. 805-810.
48. Balzarini J., Velazquez S., Sanfelix A., Karlsson A., Perezperez M. J., Camarasa M. J., Declercq E. Human-Immunodeficiency-Virus Type-1-Specific [2',5'-Bis-O-(Tert-Butyldimethylsilyl)-Beta-D-Ribofuranosyl]-3'-Spiro-5''-(4''-Amino-1'',2''-Oxathiole-2'',2''-Dioxide)-Purine Analogs Show a Resistance Spectrum That Is Different from That of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1-Specific Nonnucleoside Analogs // *Molecular Pharmacology*. – 1993. – T. 43, № 1. – C. 109-114.
49. Pan B. C., Chen H. C., Piras G., Dutschman G. E., Rowe E. C., Cheng Y. C., Chu S. H. Synthesis and Anti-Hiv-1 Activities of 6-Arylthio and 6-Arylselenoacyclonucleosides // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1994. – T. 31, № 1. – C. 177-185.

50. Hopkins A. L., Ren J. S., Tanaka H., Baba M., Okamoto M., Stuart D. I., Stammers D. K. Design of MKC-442 (emivirine) analogues with improved activity against drug-resistant HIV mutants // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – T. 42, № 22. – C. 4500-4505.
51. Sun G. F., Chen X. X., Chen F. E., Wang Y. P., De Clercq E., Balzarini J., Pannecouque C. Nonnucleoside HIV-1 reverse-transcriptase inhibitors, part 5. Synthesis and anti-HIV-1 activity of novel 6-naphthylthio HEPT analogues // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 2005. – T. 53, № 8. – C. 886-92.
52. Goudgaon N. M., Mcmillan A., Schinazi R. F. 1-(Ethoxymethyl)-6-(Phenylselenenyl)Pyrimidines with Activity against Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 and Type-2 // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. – 1992. – T. 3, № 5. – C. 263-266.
53. Goudgaon N. M., Schinazi R. F. Activity of Acyclic 6-(Phenylselenenyl)Pyrimidine Nucleosides against Human Immunodeficiency Viruses in Primary Lymphocytes // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1991. – T. 34, № 11. – C. 3305-3309.
54. Kim D. K., Kim Y. W., Gam J. S., Kim G. Y., Lim J. S., Lee N. Y., Kim H. T., Kim K. H. Synthesis and anti-HIV-1 activity of a series of 1-(alkoxymethyl)-5-alkyl-6-(arylselenenyl)uracils and 2-thiouracils // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1996. – T. 33, № 4. – C. 1275-1283.
55. Nguyen M. H., Schinazi R. F., Shi C. F., Goudgaon N. M., McKenna P. M., Mellors J. W. Resistance of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 to Acyclic 6-Phenylselenenylpyrimidine and 6-Phenylthiopyrimidine // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1994. – T. 38, № 10. – C. 2409-2414.
56. Kim D. K., Kim H. T., Lim J. S., Gam J., Kim Y. W., Kim K. H., Shin Y. O. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 1,5-dialkyl-6-(arylselenenyl)uracils and -2-thiouracils // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1996. – T. 33, № 3. – C. 885-894.
57. Tanaka H., Baba M., Hayakawa H., Sakamaki T., Miyasaka T., Ubasawa M., Takashima H., Sekiya K., Nitta I., Shigeta S., Walker R. T., Balzarini J., Declercq E. A New Class of Hiv-1-Specific 6-Substituted Acyclouridine Derivatives - Synthesis and Anti-Hiv-1 Activity of 5-Substituted or 6-Substituted Analogs of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(Phenylthio)Thymine (Hept) // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1991. – T. 34, № 1. – C. 349-357.
58. Tanaka H., Takashima H., Ubasawa M., Sekiya K., Nitta I., Baba M., Shigeta S., Walker R. T., Declercq E., Miyasaka T. Structure-Activity-Relationships of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(Phenylthio)Thymine Analogs - Effect of Substitutions at the C-6 Phenyl Ring and at the C-5 Position on Anti-Hiv-1 Activity // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1992. – T. 35, № 2. – C. 337-345.
59. Novikov M. S., Geisman A. N. Methods of Synthesis of 6-Substituted Uracil Derivatives - the Structural Base of Antiviral Agents (Review) // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2014. – T. 49, № 10. – C. 1426-1450.
60. Baba M., Shigeta S., Yuasa S., Takashima H., Sekiya K., Ubasawa M., Tanaka H., Miyasaka T., Walker R. T., Declercq E. Preclinical Evaluation of Mkc-442, a Highly Potent and Specific Inhibitor of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 in-Vitro // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1994. – T. 38, № 4. – C. 688-692.
61. Meng G., Chen F. E., De Clercq E., Balzarini J., Pannecouque C. Nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: Part I. Synthesis and structure-activity relationship of 1-alkoxymethyl-5-alkyl-6-naphthylmethyl uracils as HEPT analogues // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. – 2003. – T. 51, № 7. – C. 779-789.

62. Tanaka H., Takashima H., Ubasawa M., Sekiya K., Inouye N., Baba M., Shigeta S., Walker R. T., Declercq E., Miyasaka T. Synthesis and Antiviral Activity of 6-Benzyl Analogs of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(Phenylthio)Thymine (Hept) as Potent and Selective Anti-Hiv-1 Agents // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1995. – T. 38, № 15. – C. 2860-2865.
63. El-Brollosy N. R., Jorgensen P. T., Dahan B., Boel A. M., Pedersen E. B., Nielsen C. Synthesis of novel N-1 (allyloxymethyl) analogues of 6-benzyl-1-(ethoxymethyl)-5-isopropyluracil (MKC-442, emivirine) with improved activity against HIV-1 and its mutants // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – T. 45, № 26. – C. 5721-5726.
64. El-Brollosy N. R., Pedersen E. B., Nielsen C. Synthesis of novel MKC-442 analogues with potent activities against HIV-1 // *Archiv Der Pharmazie*. – 2003. – T. 336, № 4-5. – C. 236-241.
65. El-Brollosy N. R., Loddo R. Synthesis and Antiviral Evaluation of 1-[(2-Phenoxyethyl)oxymethyl] and 6-(3,5-Dimethoxybenzyl) Analogues of HIV Drugs Emivirine and TNK-651 // *Drug Res (Stuttg)*. – 2016. – T. 66, № 4. – C. 181-8.
66. Wamberg M., Pedersen E. B., El-Brollosy N. R., Nielsen C. Synthesis of 6-arylvinyl analogues of the HIV drugs SJ-3366 and Emivirine // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2004. – T. 12, № 5. – C. 1141-1149.
67. Loksha Y. M., Pedersen E. B., Loddo R., La Colla P. Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of 1-Substituted 6-(3-Cyanobenzoyl) and [(3-Cyanophenyl)fluoromethyl]-5-ethyl-uracils // *Archiv Der Pharmazie*. – 2009. – T. 342, № 9. – C. 501-506.
68. Mitchell M. L., Son J. C., Guo H. Y., Im Y. A., Cho E. J., Wang J. H., Hayes J., Wang M., Paul A., Lansdon E. B., Chen J. M., Graupe D., Rhodes G., He G. X., Geleziunas R., Xu L. H., Kim C. U. N1-Alkyl pyrimidinediones as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – T. 20, № 5. – C. 1589-1592.
69. Aly Y. L., Pedersen E. B., La Colla P., Loddo R. Synthesis and Anti-HIV-1 activity of 1,3-phenylene bis-uracil analogues of MKC-442 // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 2007. – T. 44, № 2. – C. 381-387.
70. Ji L., Chen F. E., Feng X. Q., De Clercq E., Balzarini J., Pannecouque C. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, Part 7. - synthesis, antiviral activity, and 3D-QSAR investigations of novel 6-(1-naphthoyl) HEPT analogues // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. – 2006. – T. 54, № 9. – C. 1248-1253.
71. Ji L., Chen F. E., Xie B., De Clercq E., Balzarini J., Pannecouque C. Synthesis and anti-HIV activity evaluation of 1-[alkenyl or alkynyl or alkyloxy)methyl]-5-alkyl-6-(1-naphthoyl)-2,4-pyrimidinediones as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2007. – T. 42, № 2. – C. 198-204.
72. Petersen L., Jessen C. H., Pedersen E. B., Nielsen C. Synthesis and evaluation of new potential HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. New analogues of MKC-442 containing Michael acceptors in the C-6 position // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2003. – T. 1, № 20. – C. 3541-3545.
73. Son J.-C., Lee I.-Y., Bae B.-I., Han J.-S., Choi J.-K., Y.-B. C. Antiviral 2,4-pyrimidinedione derivatives // *Book Antiviral 2,4-pyrimidinedione derivatives* / Editor, 1998.
74. Son J.-C., Shin S.-S., Kim S.-K., Lee C.-K., H.-S. K. Antiviral 2,4-pyrimidinedione derivatives and process for the preparation thereof. // *Book Antiviral 2,4-pyrimidinedione derivatives and process for the preparation thereof*. / Editor, 2004.

75. Elshehry M. F., Balzarini J., Meier C. Synthesis of New Cyclic and Acyclic 5-Halouridine Derivatives as Potential Antiviral Agents // *Synthesis-Stuttgart*. – 2009.10.1055/s-0028-1083369 № 5. – C. 841-847.
76. Geisman A. N., Valuev-Elliston V. T., Ozerov A. A., Khandazhinskaya A. L., Chizhov A. O., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Naesens L., Seley-Radtke K. L., Novikov M. S. 1,6-Bis[(benzyloxy)methyl]uracil derivatives-Novel antivirals with activity against HIV-1 and influenza H1N1 virus // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2016. – T. 24, № 11. – C. 2476-2485.
77. Nazaretyan A. K., Torosyan G. O., Babayan A. T. Quarternary Ammonium-Salts in Alkylation Reactions (Synthesis of Formaldehyde Acetals) .24. // *Journal of Applied Chemistry of the Ussr*. – 1985. – T. 58, № 11. – C. 2396-2400.
78. Tanaka H., Baba M., Takahashi E., Matsumoto K., Kittaka A., Walker R. T., De Clercq E., Miyasaka T. Design and Synthesis of Regioisomeric Analogues of a Specific Anti-HIV-1 Agent 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1994. – T. 13, № 1-3. – C. 155-162.
79. Boudet N., Knochel P. Chemo- and regioselective functionalization of uracil derivatives. Applications to the synthesis of oxypurinol and emivirine // *Org Lett*. – 2006. – T. 8, № 17. – C. 3737-40.
80. Danel K., Larsen E., Pedersen E. B. Easy Synthesis of 5,6-Disubstituted Acyclouridine Derivatives // *Synthesis-Stuttgart*. – 1995. – T. 8. – C. 934-936.
81. El-Brollosy N. R., Al-Deeb O. A., El-Emam A. A., Pedersen E. B., La Colla P., Collu G., Sanna G., Loddo R. Synthesis of novel uracil non-nucleoside derivatives as potential reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 // *Arch Pharm (Weinheim)*. – 2009. – T. 342, № 11. – C. 663-70.
82. Mitchell M. L., Son J. C., Lee I. Y., Lee C. K., Kim H. S., Guo H. Y., Wang J. H., Hayes J., Wang M., Paul A., Lansdon E. B., Chen J. M., Eisenberg G., Geleziunas R., Xu L. H., Kim C. U. N1-Heterocyclic pyrimidinediones as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – T. 20, № 5. – C. 1585-1588.
83. Buckheit R. W., Hartman T. L., Watson K. M., Chung S. G., Cho E. H. Comparative evaluation of the inhibitory activities of a series of pyrimidinedione congeners that inhibit human immunodeficiency virus types 1 and 2 // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – T. 52, № 1. – C. 225-236.
84. Buckheit R. W., Jr., Hartman T. L., Watson K. M., Kwon H. S., Lee S. H., Lee J. W., Kang D. W., Chung S. G., Cho E. H. The structure-activity relationships of 2,4(1H,3H)-pyrimidinedione derivatives as potent HIV type 1 and type 2 inhibitors // *Antivir Chem Chemother*. – 2007. – T. 18, № 5. – C. 259-75.
85. Watson Buckheit K., Yang L., Buckheit R. W., Jr. Development of dual-acting pyrimidinediones as novel and highly potent topical anti-HIV microbicides // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2011. – T. 55, № 11. – C. 5243-54.
86. Buckheit R. W., Jr., Watson Buckheit K., Sturdevant C. B., Buckheit R. W., 3rd. Selection and characterization of viruses resistant to the dual acting pyrimidinedione entry and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor IQP-0410 // *Antiviral Res*. – 2013. – T. 100, № 2. – C. 382-91.
87. Buckheit R. W., Watson K., Fliakas-Boltz V., Russell J., Loftus T. L., Osterling M. C., Turpin J. A., Pallansch L. A., White E. L., Lee J. W., Lee S. H., Oh J. W., Kwon H. S., Chung S.

- G., Cho E. H. SJ-3366, a unique and highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that also inhibits HIV-2 // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – T. 45, № 2. – C. 393-400.
88. Mahalingam A., Simmons A. P., Ugaonkar S. R., Watson K. M., Dezzutti C. S., Rohan L. C., Buckheit R. W., Jr., Kiser P. F. Vaginal microbicide gel for delivery of IQP-0528, a pyrimidinedione analog with a dual mechanism of action against HIV-1 // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2011. – T. 55, № 4. – C. 1650-60.
89. Pereira L. E., Mesquita P. M. M., Ham A., Singletary T., McNicholl J., Buckheit K. W., Buckheit R. W., Smith J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of a Dual Compartment Duogel (Tm) Containing the Nnrti Iqp-0528 in Female Rhesus Macaques // *Journal of Medical Primatology*. – 2015. – T. 44, № 5. – C. 320-320.
90. Pereira L. E., Singletary T., Martin A., Dinh C. T., Deyoungs F., Holder A., McNicholl J., Buckheit K. W., Buckheit R. W., Ham A., Katz D. F., Smith J. M. Effects of gel volume on pharmacokinetics for vaginal and rectal applications of combination DuoGel-IQB4012, a dual chamber-dual drug HIV microbicide gel, in pigtailed macaques // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2018. – T. 8, № 5. – C. 1180-1190.
91. Ham A. S., Rohan L. C., Boczar A., Yang L., Buckheit K. W., Buckheit R. W. Vaginal Film Drug Delivery of the Pyrimidinedione IQP-0528 for the Prevention of HIV Infection // *Pharmaceutical Research*. – 2012. – T. 29, № 7. – C. 1897-1907.
92. Srinivasan P., Zhang J. N., Martin A., Kelley K., McNicholl J. M., Buckheit R. W., Smith J. M., Ham A. S. Safety and Pharmacokinetics of Quick-Dissolving Polymeric Vaginal Films Delivering the Antiretroviral IQP-0528 for Preexposure Prophylaxis // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2016. – T. 60, № 7. – C. 4140-4150.
93. Al-Khouja A., Shieh E., Fuchs E. J., Marzinke M. A., Bakshi R. P., Hummert P., Ham A. S., Buckheit K. W., Breakey J., Weld E. D., Chen H., Caffo B. S., Buckheit R. W., Hendrix C. W. Examining the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of a Rectally Administered IQP-0528 Gel for HIV Pre-Exposure Prophylaxis: A First-In-Human Study // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 2021.10.1089/AID.2020.0188.
94. Danel K. 5,6-Dihydropyrrolo[1,2-c]pyrimidine-1,3(2H,5H)-diones as Annulated Analogues of the Anti-HIV Compound MKC-442 (6-Benzyl-1-(ethoxymethyl)-5-isopropyluracil) // *Synthesis-Stuttgart*. – 1997. – T. 9. – C. 1021-1026.
95. Loksha Y. M., Pedersen E. B., Loddo R., Sanna G., Collu G., Giliberti G., La Colla P. Synthesis of novel fluoro analogues of MKC442 as microbicides // *J Med Chem*. – 2014. – T. 57, № 12. – C. 5169-78.
96. Bardagi J. I., Rossi R. A. A novel approach to the synthesis of 6-substituted uracils in three-step, one-pot reactions // *J Org Chem*. – 2008. – T. 73, № 12. – C. 4491-5.
97. Nichols S. E., Domaoal R. A., Thakur V. V., Tirado-Rives J., Anderson K. S., Jorgensen W. L. Discovery of Wild-Type and Y181C Mutant Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors Using Virtual Screening with Multiple Protein Structures // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2009. – T. 49, № 5. – C. 1272-1279.
98. Bollini M., Domaoal R. A., Thakur V. V., Gallardo-Macias R., Spasov K. A., Anderson K. S., Jorgensen W. L. Computationally-Guided Optimization of a Docking Hit to Yield Catechol Diethers as Potent Anti-HIV Agents // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – T. 54, № 24. – C. 8582-8591.

99. Chan J. H., Freeman G. A., Tidwell J. H., Romines K. R., Schaller L. T., Cowan J. R., Gonzales S. S., Lowell G. S., Andrews C. W., Reynolds D. J., St Clair M., Hazen R. J., Ferris R. G., Creech K. L., Roberts G. B., Short S. A., Weaver K., Koszalka G. W., Boone L. R. Novel benzophenones as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – T. 47, № 5. – C. 1175-1182.
100. 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. – T. 12, № 8. – C. 2405-2413.
101. Janssen P. A. J., Lewi P. J., Arnold E., Daeyaert F., de Jonge M., Heeres J., Koymans L., Vinkers M., Guillemont J., Pasquier E., Kukla M., Ludovici D., Andries K., de Bethune M. P., Pauwels R., Das K., Clark A. D., Frenkel Y. V., Hughes S. H., Medaer B., De Knaep F., Bohets H., De Clerck F., Lampo A., Williams P., Stoffels P. In search of a novel anti-HIV drug: Multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6dimethylphenyl] amino]-2-pyrimidinyl]amino]-benzonitrile (R278474, rilpivirine) // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2005. – T. 48, № 6. – C. 1901-1909.
102. Lee W. G., Gallardo-Macias R., Frey K. M., Spasov K. A., Bollini M., Anderson K. S., Jorgensen W. L. Picomolar Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase Featuring Bicyclic Replacement of a Cyanovinylphenyl Group // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – T. 135, № 44. – C. 16705-16713.
103. Lee W. G., Frey K. M., Gallardo-Macias R., Spasov K. A., Bollini M., Anderson K. S., Jorgensen W. L. Picomolar Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase: Design and Crystallography of Naphthyl Phenyl Ethers // *Acs Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – T. 5, № 11. – C. 1259-1262.
104. Lee W. G., Chan A. H., Spasov K. A., Anderson K. S., Jorgensen W. L. Design, Conformation, and Crystallography of 2-Naphthyl Phenyl Ethers as Potent Anti-HIV Agents // *Acs Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – T. 7, № 12. – C. 1156-1160.
105. Kudalkar S. N., Beloor J., Chan A. H., Lee W. G., Jorgensen W. L., Kumar P., Anderson K. S. Structural and Preclinical Studies of Computationally Designed Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors for Treating HIV infection // *Molecular Pharmacology*. – 2017. – T. 91, № 4. – C. 383-U168.
106. Kudalkar S. N., Beloor J., Quijano E., Spasov K. A., Lee W. G., Cisneros J. A., Saltzman W. M., Kumar P., Jorgensen W. L., Anderson K. S. From in silico hit to long-acting late-stage preclinical candidate to combat HIV-1 infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – T. 115, № 4. – C. E802-E811.
107. Sweeney Z. K., Kennedy-Smith J. J., Wu J., Arora N., Billedeau J. R., Davidson J. R., Fretland J., Hang J. Q., Heilek G. M., Harris S. F., Hirschfeld D., Inbar P., Javanbakht H., Jernelius J. A., Jin Q. W., Li Y., Liang W. L., Roetz R., Sarma K., Smith M., Stefanidis D., Su G. P., Suh J. M., Villasenor A. G., Welch M., Zhang F. J., Klumpp K. Diphenyl Ether Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Excellent Potency Against Resistant Mutant Viruses and Promising Pharmacokinetic Properties // *Chemmedchem*. – 2009. – T. 4, № 1. – C. 88-99.
108. Zhang H., Tian Y., Kang D. W., Huo Z. P., Zhou Z. X., Liu H. Q., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Y. Discovery of uracil-bearing DAPYs derivatives as novel

- HIV-1 NNRTIs via crystallographic overlay-based molecular hybridization // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – T. 130. – C. 209-222.
109. McKay A. F., Baker H. A., Gaudry R., Garmaise D. L., Ranz R. J. Bacteriostats. VII. Substituted benzylphenols. // *J. Med. Chem.* – 1963. – T. 6, № 6. – C. 816-817.
110. Claisen L., Kremers F., Roth F., Tietze E. Über C-Alkylierung (Kernalkylierung) von Phenolen. // *Justus Lieb. Ann. Chemie.* – 1925. – T. 442. – C. 210-245.
111. Kikumoto R., Tobe A., Fukami H., Egawa M. Synthesis and antianxiety activity of (omega-piperazinylalkoxy)indan derivatives // *J Med Chem.* – 1983. – T. 26, № 2. – C. 246-50.
112. Novikov M. S., Ozerov A. A. The silyl method for the synthesis of 1-[2-(phenoxy)ethyl]uracils // *Chem. Heterocycl. Compd.* . – 2005. – T. 41. – C. 905-908.
113. Frieden M., Giraud M., Reese C. B., Song Q. L. Synthesis of 1-[cis-3-(hydroxymethyl)cyclobutyl]-uracil, -thymine and -cytosine // *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. – 1998.DOI 10.1039/a803878c № 17. – C. 2827-2832.
114. Bode M. L., Kaye P. T. Indolizine Studies .2. Synthesis and Nmr Spectroscopic Analysis of 2-Substituted Indolizines // *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. – 1993.DOI 10.1039/p19930001809 № 15. – C. 1809-1813.
115. Gourves J. P., Ruzziconi R., Vilarroig L. Oxidative coupling of O-silyl and O-alkyl enethers: Application of the novel annulation sequence to the synthesis of fluorinated naphthaldehydes and naphthyl ketones // *Journal of Organic Chemistry*. – 2001. – T. 66, № 2. – C. 617-619.
116. Hartmann R. W., Paluszczak A., Lacan F., Ricci G., Ruzziconi R. CYP 17 and CYP 19 inhibitors. Evaluation of fluorine effects on the inhibiting activity of regioselectively fluorinated 1-(naphthalen-2-ylmethyl)imidazoles // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2004. – T. 19, № 2. – C. 145-155.
117. Liu Z. Q., Chen W. M., Zhan P., De Clercq E., Pannecouque C., Liu X. Y. Design, synthesis and anti-HIV evaluation of novel diarylnicotinamide derivatives (DANAs) targeting the entrance channel of the NNRTI binding pocket through structure-guided molecular hybridization // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – T. 87. – C. 52-62.
118. Mejias X., Feliu L., Planas M., Bardaji E. Synthesis of nucleobase-functionalized beta-peptoids and beta-peptoid hybrids // *Tetrahedron Letters*. – 2006. – T. 47, № 46. – C. 8069-8071.
119. Li X., Chen W. M., Tian Y., Liu H. Q., Zhan P., De Clercq E., Pannecouque C., Balzarini J., Liu X. Y. Discovery of novel diarylpyrimidines as potent HIV NNRTIs via a structure-guided core-refining approach // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – T. 80. – C. 112-121.
120. Maruyama T., Kozai S., Yamasaki T., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., Snoeck R., Andrei G., De Clercq E. Synthesis and antiviral activity of 1,3-disubstituted uracils against HIV-1 and HCMV // *Antivir Chem Chemother.* – 2003. – T. 14, № 5. – C. 271-9.
121. Maruyama T., Kozai S., Demizu Y., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., Snoecks R., Andrei G., De Clercq E. Synthesis and anti-HIV-1 and anti-HCMV activity of 1-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 2006. – T. 54, № 3. – C. 325-33.
122. Isono Y., Sakakibara N., Ordonez P., Hamasaki T., Baba M., Ikejiri M., Maruyama T. Synthesis of 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives with potential anti-HIV activity // *Antivir Chem Chemother.* – 2011. – T. 22, № 2. – C. 57-65.

123. Ordonez P., Hamasaki T., Isono Y., Sakakibara N., Ikejiri M., Maruyama T., Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – T. 56, № 5. – C. 2581-9.
124. Sakakibara N., Hamasaki T., Baba M., Demizu Y., Kurihara M., Irie K., Iwai M., Asada E., Kato Y., Maruyama T. Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents // *Bioorg Med Chem.* – 2013. – T. 21, № 18. – C. 5900-6.
125. Sakakibara N., Baba M., Okamoto M., Toyama M., Demizu Y., Misawa T., Kurihara M., Irie K., Kato Y., Maruyama T. Design, synthesis, and anti-HIV-1 activity of 1-aromatic methyl-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil and N-3,5-dimethylbenzyl-substituted urea derivatives // *Antivir Chem Chemother.* – 2015. – T. 24, № 1. – C. 3-18.
126. 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. N1,N3-disubstituted uracils as nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // *Bioorg Med Chem.* – 2013. – T. 21, № 5. – C. 1150-8.
127. 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 // *Bioorg Med Chem.* – 2015. – T. 23, № 5. – C. 1069-81.
128. Singh H., Aggarwal P., Kumar S. A facile synthesis of 1-monosubstituted and unsymmetrically 1,3-disubstituted uracils // *Synthesis-Stuttgart.* – 1980. – T. 6. – C. 520-522.
129. Noell C. W., Cheng C. Pyrimidines. XXI. 1-(Tetrahydro-2-furyl)pyrimidines // *J. Heterocyclic Chem.* – 1968. – T. 5, № 1. – C. 25-28.
130. White R. D., Wood J. L. Progress toward the total synthesis of kalihinane diterpenoids // *Org Lett.* – 2001. – T. 3, № 12. – C. 1825-7.
131. Camarasa M. J., Perezperez M. J., Sanfelix A., Balzarini J., Declercq E. 3'-Spiro Nucleosides, a New Class of Specific Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Inhibitors - Synthesis and Antiviral Activity of [2',5'-Bis-O-(Tert-Butyldimethylsilyl)-Beta-D-Xylo and Ribofuranose]-3'-Spiro-5"-[4"-Amino-1",2"-Oxathiole 2",2"-Dioxide] (Tsao) Pyrimidine Nucleosides // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 1992. – T. 35, № 15. – C. 2721-2727.
132. Das K., Bauman J. D., Rim A. S., Dharia C., Clark A. D., Camarasa M. J., Balzarini J., Arnold E. Crystal Structure of tert-Butyldimethylsilyl-spiroaminooxathioledioxide-thymine (TSAO-T) in Complex with HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Redefines the Elastic Limits of the Non-nucleoside Inhibitor-Binding Pocket // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2011. – T. 54, № 8. – C. 2727-2737.
133. Balzarini J., Perezperez M. J., Sanfelix A., Schols D., Perno C. F., Vandamme A. M., Camarasa M. J., Declercq E. 2',5'-Bis-O-(Tert-Butyldimethylsilyl)-3'-Spiro-5"-(4"-Amino-1',2"-Oxathiole-2",2"-Dioxide)Pyrimidine (Tsao) Nucleoside Analogs - Highly Selective Inhibitors of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 That Are Targeted at the Viral Reverse-Transcriptase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1992. – T. 89, № 10. – C. 4392-4396.
134. Perez-Perez M. J., Sanfelix A., Balzarini J., Declercq E., Camarasa M. J. Tsao Analogs - Stereospecific Synthesis and Anti-Hiv-1 Activity of 1-[2',5'-Bis-0-(Tert-Butyldimethylsilyl)-

- Beta-D-Ribofuranosyl]-3'-Spiro-5''-(4''-Amino-1'',2''-Oxathiole 2'',2''-Dioxide)Pyrimidine and Pyrimidine-Modified Nucleosides // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1992. – T. 35, № 16. – C. 2988-2995.
135. Camarasa M. J., Velazquez S., San-Felix A., Perez-Perez M. J. TSAO derivatives the first non-peptide inhibitors of HIV-1 RT dimerization // *Antivir Chem Chemother*. – 2005. – T. 16, № 3. – C. 147-53.
136. Chamorro C., Camarasa M. J., Perez-Perez M. J., de Clercq E., Balzarini J., San Felix A. An approach towards the synthesis of potential metal-chelating TSAO-T derivatives as bidentate inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. – 1998. – T. 9, № 5. – C. 413-422.
137. Rodriguez-Barrios F., Perez C., Lobaton E., Velazquez S., Chamorro C., San-Felix A., Perez-Perez M. J., Camarasa M. J., Pelemans H., Balzarini J., Gago F. Identification of a putative binding site for [2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)thymine (TSAO) derivatives at the p51-p66 interface of HIV-1 reverse transcriptase // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2001. – T. 44, № 12. – C. 1853-1865.
138. Bonache M. C., Chamorro C., Velazquez S., De Clercq E., Balzarini J., Barrios F. R., Gago F., Camarasa M. J., San-Felix A. Improving the antiviral efficacy and selectivity of HIV-1 reverse transcriptase inhibitor TSAO-T by the introduction of functional groups at the N-3 position // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2005. – T. 48, № 21. – C. 6653-6660.
139. Moura M., Josse S., Albert N. V. N., Fournier C., Duverlie G., Castelain S., Soriano E., Marco-Contelles J., Balzarini J., Postel D. Synthesis and in vitro activity of novel N-3 acylated TSAO-T compounds against HIV-1 and HCV // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – T. 46, № 10. – C. 5046-5056.
140. Calvo-Mateo A., Camarasa M. J., Diazortiz A., Heras F. G. D., Alemany A. Synthesis of 3'-C-Cyano-3'-Deoxy-Pentofuranosylthymine Nucleosides // *Tetrahedron*. – 1988. – T. 44, № 15. – C. 4895-4903.
141. Hollemberg D. H., Klein R. S., Fox J. J. Pyridinium chloro chromate for the oxidation of carbohydrates // *Carbohydr. Rev*. – 1978. – T. 67. – C. 491-494.
142. Vorbruggen H., Krolikiewicz K., Bennua B. Nucleoside Syntheses .22. Nucleoside Synthesis with Trimethylsilyl Triflate and Perchlorate as Catalysts // *Chemische Berichte-Recueil*. – 1981. – T. 114, № 4. – C. 1234-1255.
143. 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.
144. 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.
145. 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.

146. Tantillo C., Ding J., Jacobo-Molina A., Nanni R. G., Boyer P. L., Hughes S. H., Pauwels R., Andries K., Janssen P. A., Arnold E. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance // *J Mol Biol.* – 1994. – T. 243, № 3. – C. 369-87.
147. Tramontano E., Di Santo R. HIV-1 RT-associated RNase H function inhibitors: Recent advances in drug development // *Curr Med Chem.* – 2010. – T. 17, № 26. – C. 2837-53.
148. Asante-Appiah E., Skalka A. M. HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis // *Adv Virus Res.* – 1999. – T. 52. – C. 351-69.
149. Hindmarsh P., Leis J. Retroviral DNA integration // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 1999. – T. 63, № 4. – C. 836-43, table of contents.
150. Wang Z., Bennett E. M., Wilson D. J., Salomon C., Vince R. Rationally designed dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase // *J Med Chem.* – 2007. – T. 50, № 15. – C. 3416-9.
151. Wang Z., Vince R. Synthesis of pyrimidine and quinolone conjugates as a scaffold for dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – T. 18, № 4. – C. 1293-6.
152. Tang J., Maddali K., Dreis C. D., Sham Y. Y., Vince R., Pommier Y., Wang Z. N-3 Hydroxylation of Pyrimidine-2,4-diones Yields Dual Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase and Integrase // *ACS Med Chem Lett.* – 2011. – T. 2, № 1. – C. 63-67.
153. Tang J., Maddali K., Metifiot M., Sham Y. Y., Vince R., Pommier Y., Wang Z. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-diones as an inhibitor scaffold of HIV integrase // *J Med Chem.* – 2011. – T. 54, № 7. – C. 2282-92.
154. Tang J., Maddali K., Dreis C. D., Sham Y. Y., Vince R., Pommier Y., Wang Z. 6-Benzoyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones as dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2011. – T. 21, № 8. – C. 2400-2.
155. Tang J., Kirby K. A., Huber A. D., Casey M. C., Ji J., Wilson D. J., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Cyclohexylmethyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-dione as an inhibitor scaffold of HIV reverse transcriptase: Impacts of the 3-OH on inhibiting RNase H and polymerase // *Eur J Med Chem.* – 2017. – T. 128. – C. 168-179.
156. Tang J., Liu F., Nagy E., Miller L., Kirby K. A., Wilson D. J., Wu B., Sarafianos S. G., Parniak M. A., Wang Z. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-diones as Selective Active Site Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase-Associated RNase H: Design, Synthesis, and Biochemical Evaluations // *J Med Chem.* – 2016. – T. 59, № 6. – C. 2648-59.
157. Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Xie J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Arylthio-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H with antiviral activity // *Eur J Med Chem.* – 2018. – T. 156. – C. 652-665.
158. Tang J., Do H. T., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. Pharmacophore-based design of novel 3-hydroxypyrimidine-2,4-dione subtypes as inhibitors of HIV reverse transcriptase-associated RNase H: Tolerance of a nonflexible linker // *Eur J Med Chem.* – 2019. – T. 166. – C. 390-399.
159. Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Biphenylmethyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently and selectively inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H // *Eur J Med Chem.* – 2018. – T. 156. – C. 680-691.

160. Wu B., Tang J., Wilson D. J., Huber A. D., Casey M. C., Ji J., Kankanala J., Xie J., Sarafianos S. G., Wang Z. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-dione-5-N-benzylcarboxamides Potently Inhibit HIV-1 Integrase and RNase H // *J Med Chem.* – 2016. – T. 59, № 13. – C. 6136-48.
161. Yoneda F., Tsukuda K., Kawazoe M., Sone A. Synthesis and Properties of 1-Benzothiopyrano[2,3-D]-Pyrimidine-2,4-(3h)Diones (10-Thia-5-Deazaflavins) // *Journal of Heterocyclic Chemistry.* – 1981. – T. 18, № 7. – C. 1329-1334.
162. Griffiths P. D., Walter S. Cytomegalovirus // *Curr Opin Infect Dis.* – 2005. – T. 18, № 3. – C. 241-5.
163. Bialas K. M., Swamy G. K., Permar S. R. Perinatal cytomegalovirus and varicella zoster virus infections: epidemiology, prevention, and treatment // *Clin Perinatol.* – 2015. – T. 42, № 1. – C. 61-75, viii.
164. Swanson E. C., Schleiss M. R. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy // *Pediatr Clin North Am.* – 2013. – T. 60, № 2. – C. 335-49.
165. de Castro S., Lobaton E., Perez-Perez M. J., San-Felix A., Cordeiro A., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E., Balzarini J., Camarasa M. J., Velazquez S. Novel [2',5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) derivatives with anti-HIV-1 and anti-human-cytomegalovirus activity // *J Med Chem.* – 2005. – T. 48, № 4. – C. 1158-68.
166. de Castro S., Peromingo M. T., Naesens L., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Velazquez S., Camarasa M. J. 4''-Benzoylureido-TSAO derivatives as potent and selective non-nucleoside HCMV inhibitors. Structure-activity relationship and mechanism of antiviral action // *J Med Chem.* – 2008. – T. 51, № 18. – C. 5823-32.
167. 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. – T. 21, № 14. – C. 4151-4157.
168. Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome // *Science.* – 1989. – T. 244, № 4902. – C. 359-62.
169. Randolph J. T., Krueger A. C., Donner P. L., Pratt J. K., Liu D., Motter C. E., Rockway T. W., Tufano M. D., Wagner R., Lim H. B., Beyer J. M., Mondal R., Panchal N. S., Colletti L., Liu Y., Koev G., Kati W. M., Hernandez L. E., Beno D. W. A., Longenecker K. L., Stewart K. D., Dumas E. O., Molla A., Maring C. J. Synthesis and Biological Characterization of Aryl Uracil Inhibitors of Hepatitis C Virus NS5B Polymerase: Discovery of ABT-072, a trans-Stilbene Analog with Good Oral Bioavailability // *J Med Chem.* – 2018. – T. 61, № 3. – C. 1153-1163.
170. Krueger A. C., Randolph J. T., DeGoey D. A., Donner P. L., Flentge C. A., Hutchinson D. K., Liu D., Motter C. E., Rockway T. W., Wagner R., Beno D. W., Koev G., Lim H. B., Beyer J. M., Mondal R., Liu Y., Kati W. M., Longenecker K. L., Molla A., Stewart K. D., Maring C. J. Aryl uracil inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase: synthesis and characterization of analogs with a fused 5,6-bicyclic ring motif // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2013. – T. 23, № 12. – C. 3487-90.
171. Talamas F. X., Abbot S. C., Anand S., Brameld K. A., Carter D. S., Chen J., Davis D., de Vicente J., Fung A. D., Gong L., Harris S. F., Inbar P., Labadie S. S., Lee E. K., Lemoine R., Le Pogam S., Leveque V., Li J., McIntosh J., Najera I., Park J., Railkar A., Rajyaguru S., Sangi M., Schoenfeld R. C., Staben L. R., Tan Y., Taygerly J. P., Villasenor A. G., Weller P. E. Discovery

- of N-[4-[6-tert-butyl-5-methoxy-8-(6-methoxy-2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-3-quinolyl]phenyl]methanesulfonamide (RG7109), a potent inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase // *J Med Chem.* – 2014. – T. 57, № 5. – C. 1914-31.
172. Kati W., Koev G., Irvin M., Beyer J., Liu Y., Krishnan P., Reisch T., Mondal R., Wagner R., Molla A., Maring C., Collins C. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – T. 59, № 3. – C. 1505-11.
173. Kwo P. Y., Badshah M. B. New hepatitis C virus therapies: drug classes and metabolism, drug interactions relevant in the transplant settings, drug options in decompensated cirrhosis, and drug options in end-stage renal disease // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2015. – T. 20, № 3. – C. 235-41.
174. Trivella J. P., Gutierrez J., Martin P. Dasabuvir : a new direct antiviral agent for the treatment of hepatitis C // *Expert Opin Pharmacother.* – 2015. – T. 16, № 4. – C. 617-24.
175. El Kassas M., Elbaz T., Hafez E., Wifi M. N., Esmat G. Discovery and preclinical development of dasabuvir for the treatment of hepatitis C infection // *Expert Opin Drug Discov.* – 2017. – T. 12, № 6. – C. 635-642.
176. Martinello M., Bajis S., Dore G. J. Progress Toward Hepatitis C Virus Elimination: Therapy and Implementation // *Gastroenterol Clin North Am.* – 2020. – T. 49, № 2. – C. 253-277.
177. Barnes D. M., Shekhar S., Dunn T. B., Barkalow J. H., Chan V. S., Franczyk T. S., Haight A. R., Hengeveld J. E., Kolaczowski L., Kotecki B. J., Liang G., Marek J. C., McLaughlin M. A., Montavon D. K., Napier J. J. Discovery and Development of Metal-Catalyzed Coupling Reactions in the Synthesis of Dasabuvir, an HCV-Polymerase Inhibitor // *J Org Chem.* – 2019. – T. 84, № 8. – C. 4873-4892.
178. Magri A., Ozerov A. A., Tunitskaya V. L., Valuev-Elliston V. T., Wahid A., Pirisi M., Simmonds P., Ivanov A. V., Novikov M. S., Patel A. H. Exploration of acetanilide derivatives of 1-(omega-phenoxyalkyl)uracils as novel inhibitors of Hepatitis C Virus replication // *Sci Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 29487.
179. Cox N., Tillmann H. Emerging pipeline drugs for hepatitis B infection // *Expert Opin Emerg Drugs.* – 2011. – T. 16, № 4. – C. 713-29.
180. Lai C. L., Yuen M. F. Chronic hepatitis B--new goals, new treatment // *N Engl J Med.* – 2008. – T. 359, № 23. – C. 2488-91.
181. Tang C. M., Yau T. O., Yu J. Management of chronic hepatitis B infection: current treatment guidelines, challenges, and new developments // *World J Gastroenterol.* – 2014. – T. 20, № 20. – C. 6262-78.
182. Xie Y. H., Hong R., Liu W., Liu J., Zhai J. W. Development of novel therapeutics for chronic hepatitis B // *Virol Sin.* – 2010. – T. 25, № 4. – C. 294-300.
183. Huber A. D., Michailidis E., Tang J., Puray-Chavez M. N., Boftsi M., Wolf J. J., Boschert K. N., Sheridan M. A., Leslie M. D., Kirby K. A., Singh K., Mitsuya H., Parniak M. A., Wang Z., Sarafianos S. G. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-Diones as Novel Hepatitis B Virus Antivirals Targeting the Viral Ribonuclease H // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – T. 61, № 6.
184. Liuzzi M., Mason S. W., Cartier M., Lawetz C., McCollum R. S., Dansereau N., Bolger G., Lapeyre N., Gaudette Y., Lagace L., Massariol M. J., Do F., Whitehead P., Lamarre L., Scouten E., Bordeleau J., Landry S., Rancourt J., Fazal G., Simoneau B. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase // *J Virol.* – 2005. – T. 79, № 20. – C. 13105-15.

185. Mason S. W., Lawetz C., Gaudette Y., Do F., Scouten E., Lagace L., Simoneau B., Liuzzi M. Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – T. 32, № 16. – C. 4758-67.
186. Sudo K., Miyazaki Y., Kojima N., Kobayashi M., Suzuki H., Shintani M., Shimizu Y. YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action // *Antiviral Res.* – 2005. – T. 65, № 2. – C. 125-31.
187. Laganas V. A., Dunn E. F., McLaughlin R. E., Tiong-Yip C. L., Yuzhakov O., Isabella V. M., Hill P., Yu Q. Characterization of novel respiratory syncytial virus inhibitors identified by high throughput screen // *Antiviral Res.* – 2015. – T. 115. – C. 71-4.
188. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance // *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* – 2014. – T. 4, № 1. – C. 26-33.
189. Eckardt A. J., Baumgart D. C. Viral gastroenteritis in adults // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* – 2011. – T. 6, № 1. – C. 54-63.
190. Gonzalez-Lopez J. J., Morcillo-Laiz R., Munoz-Negrete F. J. Adenoviral keratoconjunctivitis: an update // *Arch Soc Esp Oftalmol.* – 2013. – T. 88, № 3. – C. 108-15.
191. Gupta P., Tobias J. D., Goyal S., Hervie P., Harris J. B., Sadot E., Noviski N. Prolonged mechanical support in children with severe adenoviral infections: a case series and review of the literature // *J Intensive Care Med.* – 2011. – T. 26, № 4. – C. 267-72.
192. Lu X., Trujillo-Lopez E., Lott L., Erdman D. D. Quantitative real-time PCR assay panel for detection and type-specific identification of epidemic respiratory human adenoviruses // *J Clin Microbiol.* – 2013. – T. 51, № 4. – C. 1089-93.
193. Lynch J. P., 3rd, Fishbein M., Echavarria M. Adenovirus // *Semin Respir Crit Care Med.* – 2011. – T. 32, № 4. – C. 494-511.
194. Nikitenko N. A., Gureeva E. S., Ozerov A. A., Tukhvatulin A. I., Izhaeva F. M., Prassolov V. S., Deryabin P. G., Novikov M. S., Logunov D. Y. 1-(4-Phenoxybenzyl) 5-Aminouracil Derivatives and Their Analogues - Novel Inhibitors of Human Adenovirus Replication // *Acta Naturae.* – 2018. – T. 10, № 2. – C. 58-64.
195. Robinson C. M., Seto D., Jones M. S., Dyer D. W., Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses // *Infect Genet Evol.* – 2011. – T. 11, № 6. – C. 1208-17.
196. <https://covid19.who.int/>. –
197. Kish T., Uppal P. Trifluridine/Tipiracil (Lonsurf) for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer // *P T.* – 2016. – T. 41, № 5. – C. 314-25.
198. Kim Y., Wower J., Maltseva N., Chang C., Jedrzejczak R., Wilamowski M., Kang S., Nicolaescu V., Randall G., Michalska K., Joachimiak A. Tipiracil binds to uridine site and inhibits Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2 // *Commun Biol.* – 2021. – T. 4, № 1. – C. 193.
199. Baby K., Maity S., Mehta C. H., Suresh A., Nayak U. Y., Nayak Y. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease: A Computational Drug Repurposing Study // *Arch Med Res.* – 2021. – T. 52, № 1. – C. 38-47.
200. Hakobyan A., Galindo I., Nanez A., Arabyan E., Karalyan Z., Chistov A. A., Streshnev P. P., Korshun V. A., Alonso C., Zakaryan H. Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus // *J Gen Virol.* – 2018. – T. 99, № 1. – C. 148-156.

201. Colpitts C. C., Ustinov A. V., Epand R. F., Epand R. M., Korshun V. A., Schang L. M. 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses // *J Virol.* – 2013. – T. 87, № 7. – C. 3640-54.
202. St Vincent M. R., Colpitts C. C., Ustinov A. V., Muqadas M., Joyce M. A., Barsby N. L., Epand R. F., Epand R. M., Khramyshev S. A., Valueva O. A., Korshun V. A., Tyrrell D. L., Schang L. M. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – T. 107, № 40. – C. 17339-44.
203. Chistov A. A., Orlov A. A., Streshnev P. P., Slesarchuk N. A., Aparin I. O., Rath B., Brylev V. A., Kutyakov S. V., Mikhura I. V., Ustinov A. V., Westman G., Palyulin V. A., Jain N., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Korshun V. A. Compounds based on 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil scaffold: High activity against tick-borne encephalitis virus and non-specific activity against enterovirus A // *Eur J Med Chem.* – 2019. – T. 171. – C. 93-103.
204. Orlov A. A., Chistov A. A., Kozlovskaya L. I., Ustinov A. V., Korshun V. A., Karganova G. G., Osolodkin D. I. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus (vol 7, pg 495, 2016) // *Medchemcomm.* – 2016. – T. 7, № 3. – C. 563-563.
205. Vandamme A. M., Van Vaerenbergh K., De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies // *Antivir Chem Chemother.* – 1998. – T. 9, № 3. – C. 187-203.
206. Spence R. A., Kati W. M., Anderson K. S., Johnson K. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors // *Science.* – 1995. – T. 267, № 5200. – C. 988-93.
207. Rittinger K., Divita G., Goody R. S. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – T. 92, № 17. – C. 8046-9.
208. Velazquez S., Alvarez R., San-Felix A., Jimeno M. L., De Clercq E., Balzarini J., Camarasa M. J. Synthesis and anti-HIV activity of [AZT]-[TSAO-T] and [AZT]-[HEPT] dimers as potential multifunctional inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // *J Med Chem.* – 1995. – T. 38, № 10. – C. 1641-9.
209. Velazquez S., Tunon V., Jimeno M. L., Chamorro C., De Clercq E., Balzarini J., Camarasa M. J. Potential multifunctional inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. Novel [AZT]-[TSAO-T] and [d4T]-[TSAO-T] heterodimers modified in the linker and in the dideoxynucleoside region // *J Med Chem.* – 1999. – T. 42, № 25. – C. 5188-96.
210. Pontikis R., Dolle V., Guillaumel J., Dechaux E., Note R., Nguyen C. H., Legraverend M., Bisagni E., Aubertin A. M., Grierson D. S., Monneret C. Synthesis and evaluation of "AZT-HEPT", "AZT-pyridinone", and "ddC-HEPT" conjugates as inhibitors of HIV reverse transcriptase // *J Med Chem.* – 2000. – T. 43, № 10. – C. 1927-39.
211. Danel K., Larsen L. M., Pedersen E. B., Sanna G., La Colla P., Loddio R. Synthesis and antiviral activity of new dimeric inhibitors against HIV-1 // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – T. 16, № 1. – C. 511-7.
212. Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR // *Science.* – 1996. – T. 274, № 5292. – C. 1531-4.
213. Petersen L., Jorgensen P. T., Nielsen C., Hansen T. H., Nielsen J., Pedersen E. B. Synthesis and evaluation of double-prodrugs against HIV. Conjugation of D4T with 6-benzyl-1-(ethoxymethyl)-5-isopropyluracil (MKC-442, emivirine)-type reverse transcriptase inhibitors via the SATE prodrug approach // *J Med Chem.* – 2005. – T. 48, № 4. – C. 1211-20.

214. 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. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.06.011>. – C. 169-180.
215. Maslova A. A., Matyugina E. S., Snoeck R., Andrei G., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L., Novikov M. S. Uracil-Containing Heterodimers of a New Type: Synthesis and Study of Their Anti-Viral Properties // *Molecules*. – 2020. – T. 25, № 15.
216. Agrofoglio L., Suhas E., Farese A., Condom R., Challand S. R., Earl R. A., Guedj R. Synthesis of Carbocyclic Nucleosides // *Tetrahedron*. – 1994. – T. 50, № 36. – C. 10611-10670.
217. Hayashi M., Yaginuma S., Muto N., Tsujino M. Structures of neplanocins, new antitumor antibiotics // *Nucleic Acids Symposium Series*. – 1980. № 8. – C. 65-67.
218. Kusaka T., Yamamoto H., Shibata M., Muroi M., Kishi T., Mizuno K. *Streptomyces citricolor* nov. sp. and a new antibiotic, aristeromycin // *J. Antibiot.* – 1968. – T. 21. – C. 255-263.
219. Shealy Y., Clayton J. 9-[b-DL-2a,3a-Dihydroxy-4b-(hydroxymethyl)-cyclopentyl]adenine, Carbocyclic Analog of Adenosine // *Journal of the American Chemical Society* – 1966. – T. 88. – C. 3885-3887.
220. Hasobe M., McKee J. G., Borcharding D. R., Borchardt R. T. 9-(trans-2',trans-3'-Dihydroxycyclopent-4'-enyl)-adenine and -3-deazaadenine: analogs of neplanocin A which retain potent antiviral activity but exhibit reduced cytotoxicity // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1987. – T. 31. – C. 1849-1851.
221. Koya M., Schneller S. The Synthesis of Two 2'-Deoxy Carbocyclic Purine Nucleosides Lacking the 5'-Methylene // *Tetrahedron Lett.* – 1990. – T. 31, № 41. – C. 5861-5864.
222. Trost B. M., Kuo G. H., Benneche T. A Transition-Metal-Controlled Synthesis of (±)-Aristeromycin and (±)-2',3'-diepi-Aristeromycin. An Unusual Directive Effect in Hydroxylations // *Journal of the American Chemical Society*. – 1988. № 110. – C. 621-622.
223. Yaun C. S., Liu S., Wnuk S. F., Robins M. J., R.T. B. // *Advances in Antiviral Drug Design / De Clercq E.*, 1996. – C. 233.
224. 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.
225. Dyatkina N., Semizarov D., Victorova L., Krayevsky A., Theil F., Vonjantalipinski M. Synthesis of 4 Stereoisomers of Carbocyclic 5'-nor D4a and Evaluation of Their Triphosphates as Substrates for DNA-Polymerases // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1995. – T. 14, № 3-5. – C. 723-726.
226. Deardorff D. R., Linde R. G., Martin A. M., Shulman M. J. Enantioselective Preparation of Functionalized Cyclopentanoids Via a Common Chiral (Pi-Allyl)Palladium Complex // *Journal of Organic Chemistry*. – 1989. – T. 54, № 11. – C. 2759-2762.
227. Korach M., Nielsen D. R., Rideout W. H. // *Org. Synth.* – 1973. – T. Coll. Vol. V. – C. 414.
228. Merlo V., Roberts S. M., Storer R., Bethell R. C. Synthesis and Biological-Activity of the Diphosphorylphosphonate Derivatives of (+)-Cis-9-(4'-Hydroxycyclopent-2'-Enyl)Guanine and (-)-Cis-9-(4'-Hydroxycyclopent-2'-Enyl)Guanine // *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. – 1994. DOI 10.1039/p19940001477 № 11. – C. 1477-1481.

229. Dyatkina N. B., Theil F., Vonjantalipinski M. Stereocontrolled Synthesis of the 4 Stereoisomeric Diphosphorylphosphonates of Carbocyclic 2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydro-5'-Noradenosine // *Tetrahedron*. – 1995. – Т. 51, № 3. – С. 761-772.
230. Adam A., Moffatt J. G. Dismutation reactions of nucleoside polyphosphates. V. Syntheses of P,P-di(guanosine-5') tetraphosphate and P,P-di(guanosine-5') triphosphate // *J Am Chem Soc.* – 1966. – Т. 88, № 4. – С. 838-42.
231. Grummt F. Diadenosine 5',5'''-P₁P₄-Tetraphosphate Triggers Initiation of Invitro DNA-Replication in Baby Hamster Kidney Cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1978. – Т. 75, № 1. – С. 371-375.
232. Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карпейский М. Я., Хомутов Р. М. Фосфорорганические аналоги биологически активных соединений. XII. Синтез и свойства P₁P₄-бис(5'-аденозил)тетрафосфата и их фосфонатных аналогов // *Биоорг. химия*. – 1983. – Т. 9, № 6. – С. 838-843.
233. Тарусова Н. Б., Осипова Т. И., Пурыгин П. П., Якимова И. А. Синтез P₁P₃-бис(5'-аденозил) трифосфата, P₁P₄-бис(5'-аденозил)тетрафосфата и их фосфонатных аналогов с использованием карбонильных производных азотсодержащих гетероциклов. // *Биоорг. химия*. – 1986. – Т. 12, № 3. – С. 404-407.
234. Biophosphates and Their Analogues- Synthesis, Structure, Metabolism and Activity. / Tarusova N. B., Osipova T. I., Tyrtyshev T. V., Biryukov A. I., 1987. – 195-200 с.
235. Khandazhinskaya A. L., Shirokova E. A., Skoblov Y. S., Victorova L. S., Goryunova L. Y., Beabealashvili R. S., Pronyaeva T. R., Feduk 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.
236. Shirokova E. A., Khandazhinskaya A. L., Skoblov Y. S., Goryunova L. Y., Beabealashvili 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.
237. Yegorov Y. E., Kazimirchuk 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.
238. Hegde V. R., Seley K. L., Schneller S. W. Carbocyclic 5'-noruridine // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2000. – Т. 19, № 1-2. – С. 269-273.
239. Seley K. L., Schneller S. W., Korba B. A 5'-noraristeromycin enantiomer with activity towards hepatitis B virus // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1997. – Т. 16, № 12. – С. 2095-2099.
240. Ren J., Chamberlain P. P., Stamp A., Short S. A., Weaver K. L., Romines K. R., Hazen R., Freeman A., Ferris R. G., Andrews C. W., Boone L., Chan J. H., Stammers D. K. Structural basis for the improved drug resistance profile of new generation benzophenone non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // *J Med Chem*. – 2008. – Т. 51, № 16. – С. 5000-8.
241. Matyugina E., Valyev-Elliston V. T., Novikov M. S., Alexandrova L. A., Chernoysova L. N., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L. New carbocyclic uracil derivatives as potential antiviral and antibacterial agents // *Febs Journal*. – 2013. – Т. 280. – С. 358-359.
242. 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.
243. Brulikova L., Hlavac J. Synthesis, reactivity and biological activity of 5-alkoxymethyluracil analogues // *Beilstein J Org Chem*. – 2011. – T. 7. – C. 678-98.
244. Wigerinck P., Snoeck R., Claes P., De Clercq E., Herdewijn P. Synthesis and antiviral activity of 5-heteroaryl-substituted 2'-deoxyuridines // *J Med Chem*. – 1991. – T. 34, № 6. – C. 1767-72.
245. Balzarini J., Declercq E., Baumgartner H., Bodenteich M., Griengl H. Carbocyclic 5-Iodo-2'-Deoxyuridine (C-Idu) and Carbocyclic (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine (C-Bvdu) as Unique Examples of Chiral Molecules Where the 2 Enantiomeric Forms Are Biologically-Active - Interaction of the (+)-Enantiomers and (-)-Enantiomers of C-Idu and C-Bvdu with the Thymidine Kinase of Herpes-Simplex Virus Type-1 // *Molecular Pharmacology*. – 1990. – T. 37, № 3. – C. 395-401.
246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. Gasse C., Douguet D., Huteau V., Marchal G., Munier-Lehmann H., Pochet S. Substituted benzyl-pyrimidines targeting thymidine monophosphate kinase of *Mycobacterium tuberculosis*: synthesis and in vitro anti-mycobacterial activity // *Bioorg Med Chem*. – 2008. – T. 16, № 11. – C. 6075-85.
250. 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.
251. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. –
252. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. Design and studies of novel 5-substituted alkynylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria // *J Med Chem*. – 2005. – T. 48, № 22. – C. 7012-7.
253. Van Calenbergh S. Structure-aided design of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate kinase // *Verh K Acad Geneesk Belg*. – 2006. – T. 68, № 4. – C. 223-48.
254. Neres J., Labello N. P., Somu R. V., Boshoff H. I., Wilson D. J., Vannada J., Chen L., Barry C. E., 3rd, Bennett E. M., Aldrich C. C. Inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* with nucleoside bisubstrate analogues: structure-activity relationships of the nucleobase domain of 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine // *J Med Chem*. – 2008. – T. 51, № 17. – C. 5349-70.
255. Rai D., Johar M., Srivastav N. C., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and *Mycobacterium avium* by novel dideoxy nucleosides // *J Med Chem*. – 2007. – T. 50, № 19. – C. 4766-74.

256. Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in vitro: effect of 1-beta-D-2'-arabinofuranosyl and 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-2'-ribofuranosyl) pyrimidine nucleoside analogs // *J Med Chem.* – 2007. – T. 50, № 15. – C. 3696-705.
257. Srivastav N. C., Manning T., Kunimoto D. Y., Kumar R. Studies on acyclic pyrimidines as inhibitors of mycobacteria // *Bioorg Med Chem.* – 2007. – T. 15, № 5. – C. 2045-53.
258. Srivastav N. C., Rai D., Tse C., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. Inhibition of mycobacterial replication by pyrimidines possessing various C-5 functionalities and related 2'-deoxynucleoside analogues using in vitro and in vivo models // *J Med Chem.* – 2010. – T. 53, № 16. – C. 6180-7.
259. Bohm V. P. W., Herrmann W. A. Coordination chemistry and mechanisms of metal-catalyzed C-C coupling reactions, 13 - A copper-free procedure for the palladium-catalyzed Sonogashira reaction of aryl bromides with terminal alkynes at room temperature // *European Journal of Organic Chemistry.* – 2000. – T. 2000, № 22. – C. 3679-3681.
260. Trost B. M., Kuo G. H., Benneche T. A Transition-Metal-Controlled Synthesis of (+/-)-Aristeromycin and (+/-)-2',3'-Diepi-Aristeromycin - an Unusual Directive Effect in Hydroxylations // *Journal of the American Chemical Society.* – 1988. – T. 110, № 2. – C. 621-622.
261. Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N. Convenient Synthesis of Acetylenes - Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes, and Bromopyridines // *Tetrahedron Letters.* – 1975. DOI 10.1016/s0040-4039(00)91094-3 № 50. – C. 4467-4470.
262. Klimenko A. A., Matyugina E. S., Logashenko E. B., Sol'yev 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.
263. Selective bromination of the 5-methyl group of 5 methylpyrimidine nucleosides. *Nucleic Acid Chemistry.* / Barwolff D., Langen P. – New York: Willey, 1978. *Nucleic Acid Chemistry.*
264. Levina A. S., Tabatadse D. R., Khalimskaya L. M., Prichodko T. A., Shishkin G. V., Alexandrova L. A., Zarytova V. P. Oligonucleotide Derivatives Bearing Reactive and Stabilizing Groups Attached to C5 of Deoxyuridine // *Bioconjugate Chemistry.* – 1993. – T. 4, № 5. – C. 319-325.
265. Lee B. Y., Park S. R., Jeon H. B., Kim K. S. A new solvent system for efficient synthesis of 1,2,3-triazoles // *Tetrahedron Letters.* – 2006. – T. 47, № 29. – C. 5105-5109.
266. Franzblau S. G., Witzig R. S., McLaughlin J. C., Torres P., Madico G., Hernandez A., Degnan M. T., Cook M. B., Quenzer V. K., Ferguson R. M., Gilman R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay // *J Clin Microbiol.* – 1998. – T. 36, № 2. – C. 362-6.
267. Theil F. Lipase-Supported Synthesis of Biologically-Active Compounds // *Chemical Reviews.* – 1995. – T. 95, № 6. – C. 2203-2227.
268. Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds // *Tetrahedron.* – 2007. – T. 63, № 8. – C. 1721-1754.
269. Turcu M. C., Perkio P., Kanerva L. T. Chemoenzymatic method to enantiopure sulphur heterocyclic beta-hydroxy nitriles // *Arkivoc.* – 2009.10.3998/ark.5550190.0010.320. – C. 251-263.

270. Zimmermann S. C., Sadler J. M., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. Carbocyclic 5'-nor "reverse" fleximers. Design, synthesis, and preliminary biological activity // *Medchemcomm.* – 2011. – T. 2, № 7. – C. 650-654.
271. Kogler M., Vanderhoydonck B., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Herman J., Louat T., Parchina A., Sibley C., Lescrinier E., Herdewijn P. Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis* // *J Med Chem.* – 2011. – T. 54, № 13. – C. 4847-62.
272. Merlo V., Reece F. J., Roberts S. M., Gregson M., Storer R. Synthesis of Optically-Active 5'-Noraristeromycin - Enzyme-Catalyzed Kinetic Resolution of 9-(4-Hydroxycyclopent-2-Enyl)Purines // *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1.* – 1993. DOI 10.1039/p19930001717 № 15. – C. 1717-1718.
273. Patil S. D., Schneller S. W., Hosoya M., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., De Clercq E. Synthesis and antiviral properties of (+/-)-5'-noraristeromycin and related purine carbocyclic nucleosides. A new lead for anti-human cytomegalovirus agent design // *J Med Chem.* – 1992. – T. 35, № 18. – C. 3372-7.
274. Siddiqi S. M., Chen X., Schneller S. W. Enantiospecific Synthesis of 5'-Noraristeromycin and Its 7-Deaza Derivative and a Formal Synthesis of (-)-5'-Homoaristeromycin // *Nucleosides & Nucleotides.* – 1993. – T. 12, № 3-4. – C. 267-278.
275. 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.
276. 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.
277. 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. – T. 24, № 19.
278. Groschel B., Cinatl J., Cinatl J. Viral and cellular factors for resistance against antiretroviral agents // *Intervirology.* – 1997. – T. 40, № 5-6. – C. 400-407.
279. Antonelli G., Turriziani O., Verri A., Narciso P., Ferri F., DOffizi G., Dianzani F. Long-term exposure to zidovudine affects in vitro and in vivo the efficiency of phosphorylation of thymidine kinase // *Aids Research and Human Retroviruses.* – 1996. – T. 12, № 3. – C. 223-228.
280. Chariot P., Drogou I., de Lacroix-Szmania I., Eliezer-Vanerot M. C., Chazaud B., Lombes A., Schaeffer A., Zafrani E. S. Zidovudine-induced mitochondrial disorder with massive liver steatosis, myopathy, lactic acidosis, and mitochondrial DNA depletion // *Journal of Hepatology.* – 1999. – T. 30, № 1. – C. 156-160.
281. Gelmon K., Montaner J. S. G., Fanning M., Smith J. R. M., Falutz J., Tsoukas C., Gill J., Wells G., Oshaughnessy M., Wainberg M., Ruedy J. Nature, Time Course and Dose Dependence of Zidovudine-Related Side-Effects - Results from the Multicenter Canadian Azidothymidine Trial // *Aids.* – 1989. – T. 3, № 9. – C. 555-561.

282. Pan-Zhou X. R., Cui L. X., Zhou X. J., Sommadossi J. P., Darley-USmar V. M. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – Т. 44, № 3. – С. 496-503.
283. Chiao S. K., Romero D. L., Johnson D. E. Current HIV therapeutics: Mechanistic and chemical determinants of toxicity // *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. – 2009. – Т. 12, № 1. – С. 53-60.
284. Kellam P., Boucher C. A. B., Larder B. A. 5th Mutation in Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Reverse-Transcriptase Contributes to the Development of High-Level Resistance to Zidovudine // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – Т. 89, № 5. – С. 1934-1938.
285. Ren J. S., Esnouf R. M., Hopkins A. L., Jones E. Y., Kirby I., Keeling J., Ross C. K., Larder B. A., Stuart D. I., Stammers D. K. 3'-azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Т. 95, № 16. – С. 9518-9523.
286. Stanczak A., Ferra A. Prodrugs and soft drugs // *Pharmacological Reports*. – 2006. – Т. 58, № 5. – С. 599-613.
287. Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: Challenges to the discovery scientist // *Current Drug Metabolism*. – 2003. – Т. 4, № 6. – С. 461-485.
288. Calogeropoulou T., Detsi A., Lekkas E., Koufaki M. Strategies in the design of prodrugs of anti-HIV agents // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2003. – Т. 3, № 13. – С. 1467-1495.
289. 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. 365-365.
290. Юрин О. Г., Краевский А. А., Афонина Л. Ю., Балаганин В. А., Бурова Н. В., Воронин Е. Е., Колесник А. Н., Молодов И. Б., Мошкович Г. Ф., Покровский В. В. // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2001. – Т. 1. – С. 43-45.
291. Тарусова Н. Б., Хорлин А.А., Краевский А. А., Корнилаева М. Н., Носик Д. Н., Круглов Н. Б., Галегов Г. А., Р.Ш. Б. // *Молекуляр. биология*. . – 1989. – Т. 23, № 6. – С. 1716-1724.
292. Gosselin G., Perigaud C., Lefebvre I., Pompon A., Aubertin A. M., Kirn A., Szabo T., Stawinski J., Imbach J. L. 5'-Hydrogenphosphonates of Anti-Hiv Nucleoside Analogs Revisited - Controversial Mode of Action // *Antiviral Research*. – 1993. – Т. 22, № 2-3. – С. 143-153.
293. Krayevsky A. A., Tarusova N. B., Zhu Q. Y., Vidal P., Chou T. C., Baron P., Polsky B., Jiang X. J., Matulicadamic J., Rosenberg I., Watanabe K. A. Nucleosides .156. 5'-Hydrogenphosphonates and 5'-Methylphosphonates of Sugar Modified Pyrimidine Nucleosides as Potential Anti-Hiv-1 Agents // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. – 1992. – Т. 11, № 2-4. – С. 177-196.
294. Tarusova N. B., Kukhanova M. K., Krayevsky A. A., Karamov E. K., Lukashov V. V., Kornilayeva G. B., Rodina M. A., Galegov G. A. Inhibition of Human-Immunodeficiency-Virus (Hiv) Production by 5'-Hydrogenphosphonates of 3'-Azido-2',3'-Dideoxynucleosides // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1991. – Т. 10, № 1-3. – С. 351-354.

295. Machado J., Salomon H., Oliveira M., Tsoukas C., Krayevsky A. A., Wainberg M. A. Antiviral activity and resistance profile of phosphazid - A novel prodrug of AZT // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1999. – Т. 18, № 4-5. – С. 901-906.
296. Mcguigan C., Bellevergue P., Jones B. C. N. M., Mahmood N., Hay A. J., Petrik J., Karpas A. Alkyl Hydrogen Phosphonate Derivatives of the Anti-Hiv Agent Azt May Be Less Toxic Than the Parent Nucleoside Analog // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. – 1994. – Т. 5, № 4. – С. 271-277.
297. Skoblov Y., Karpenko I., Shirokova E., Popov K., Andronova V., Galegov G., Kukhanova M. Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5 '-hydrogenphosphonate of 3 '-azido-2 ',3 '-dideoxythymidine, a prodrug of 3 '-azido-2 ',3 '-dideoxythymidine // *Antiviral Research*. – 2004. – Т. 63, № 2. – С. 107-113.
298. Кравченко А. В., Саламов Г. Г., Богословская Е. Г., Сергиенко О. Г., В.В. П. Трехкомпонентная комбинированная антиретровирусная терапия с применением ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. . – 2001. № 4. – С. 32-35.
299. Кравченко А. В., Ситдыкова Ю. Р., Серебровская Л. В., Богословская Е. В., Иванова Л. А., Покровский В. В. Комбинированная антиретровирусная терапия больных ВИЧ-инфекцией с использованием "усиленных" ингибиторов протеазы ВИЧ // *Инфекционные болезни*. – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 14-19.
300. Кравченко А. В., Канестри В. Г., Ганкина Н. Ю. Применение фосфазида в составе схем антиретровирусной терапии // *Инфекционные болезни*. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 64-69.
301. Ганкина Н. Ю., Кравченко А. В., Куимова У. А., Канестри В. Г. Нуклеозидные ингибиторы в схемах антиретровирусной терапии ко-инфекции ВИЧ и хронического гепатита С // *Инфекционные болезни*. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 14-18.
302. Пантелеев А. М., Голиусова М. Ю., Кабанов В. И. Результаты применения фосфазида (никавира) у больных с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. – 2010. № 2. – С. 75-79.
303. Иванова Э. С., Шмагель Н. Г., Воробьева Н. Н. Никавир в схемах химиопрофилактики вертикальной передачи ВИЧ-инфекции // *Вопр. вирусологии*. – 2010. – Т. 55, № 2. – С. 31-34.
304. Nikavir in Chemoprevention Regimens of Vertical HIV Transmission /Ivanova E. S., Shmagel N. G., Vorobyova N. N.: InTech.
305. Efimov V. A., Dubey I. Y., Chakhmakhcheva O. G. Nmr-Study and Improvement of H-Phosphonate Oligonucleotide Synthesis // *Nucleosides & Nucleotides*. – 1990. – Т. 9, № 3. – С. 473-477.
306. Iyer V. V., Griesgraber G. W., Radmer M. R., McIntee E. J., Wagner C. R. Synthesis, in vitro anti-breast cancer activity, and intracellular decomposition of amino acid methyl ester and alkyl amide phosphoramidate monoesters of 3 '-azido-3 '-deoxythymidine (AZT) // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2000. – Т. 43, № 11. – С. 2266-2274.
307. 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.
308. 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.

309. 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-A69.

310. Shirokova E., Khandazhinskaya A., Tarusova N., Karpenko I. Производные 5'-Н-фосфоната 3'-азидо-3'-дезокситимидина и фармацевтические композиции на их основе // Патент РФ №2187509, 20.08.2002, 2002.

311. Rosowsky A., Saha J., Fazely F., Koch J., Ruprecht R. M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by phosphonoformate esters of 3'-azido-3'-deoxythymidine // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1990. – Т. 172, № 1. – С. 288-94.

312. Kong X. B., Zhu Q. Y., Ruprecht R. M., Watanabe K. A., Zeidler J. M., Gold J. W. M., Polsky B., Armstrong D., Chou T. C. Synergistic Inhibition of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Replication In vitro by 2-Drug and 3-Drug Combinations of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine, Phosphonoformate, and 2',3'-Dideoxythymidine // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1991. – Т. 35, № 10. – С. 2003-2011.

313. Hammond J. L., Koontz D. L., Bazmi H. Z., Beadle J. R., Hostetler S. E., Kini G. D., Aldern K. A., Richman D. D., Hostetler K. Y., Mellors J. W. Alkylglycerol prodrugs of phosphonoformate are potent in vitro inhibitors of nucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 and select for resistance mutations that suppress zidovudine resistance // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Т. 45, № 6. – С. 1621-1628.

314. Shirokova E. A., Jasko M. V., Khandazhinskaya A. L., Ivanov A. V., Yanvarev D. V., Skoblov Y. S., Mitkevich V. A., Bocharov E. V., Pronyaeva 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.

315. Shirokova E. A., Jasko M. V., Khandazhinskaya A. L., Ivanov A. V., Yanvarev D. V., Skoblov Y. S., Pronyaeva T. R., Fedyuk N. V., Pokrovskii A. G., Kukhanova M. K. New phosphonoformic acid derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2004. – Т. 30, № 3. – С. 242-249.

316. 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.

317. 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.

318. 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.

319. Pokrovsky A., Pronyaeva T., Fedyuk N., Shirokova E., Khandazhinskaya A., Jasko M., Yanvarev D., Kuhanova M. 5'-Аминокарбонилфосфонаты d4T - ингибиторы репродукции вируса иммунодефицита человека // Патент РФ №2247124, 27.02.2005, 2005.

320. Khandazhinskaya A. L., Yanvarev D. V., Jasko M. V., Shipitsyn 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.
321. Khandazhinskaya A. L., Yanvarev D. V., Jasko M. V., Shipitsyn 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 (vol 37, pg 494, 2009) // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2010. – Т. 38, № 7. – С. 1258-1258.
322. Jasko M., Golubeva N., Shipitsyn A., Khandazhinskaya A., Bibilashvili R. S., Kononov A. Способ получения 5'-аминокарбонилфосфонатов нуклеозидов и способ получения хлорангидрида триметилсилильного эфира этоксикарбонилфосфоновой кислоты // Патент РФ №2446169, 27.03.2012, 2012.
323. 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.
324. Kukhanova M., Jasko M., Yanvarev D., Karpenko I., Shipitsyn A., Khandazhinskaya A. New Nucleoside and bis-Nucleoside-Phosphonate Conjugates: Design, Stability, and Anti-HIV Evaluation // *Antiviral Research*. – 2010. – Т. 86, № 1. – С. A60.
325. Cato A., 3rd, Qian J., Hsu A., Levy B., Leonard J., Granneman R. Multidose pharmacokinetics of ritonavir and zidovudine in human immunodeficiency virus-infected patients // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1998. – Т. 42, № 7. – С. 1788-93.
326. 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.
327. 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.
328. Bibilashvili R. S., Volosyuk T., Karpenko I., Kononov A., Kuhanova M., Myagkov I., Khandazhinskaya A., Shipitsyn A., Jasko M. 5'-Фосфорсодержащие производные 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина новые противовирусные агенты // Патент РФ №2373218, 20.11.2009, 2009.
329. Kuhanova M., Khandazhinskaya A., Shipitsyn A., Jasko M., Bibilashvili R. S., Volosyuk T., Golubeva N., Kononov A. Новые депо-формы зидовудина и ламивудина на основе производных фосфоновых кислот // Патент РФ №2430104, 27.09.2011, 2011.
330. Andrei G., Lisco A., Vanpouille C., Introini A., Balestra E., van den Oord J., Cihlar T., Perno C. F., Snoeck R., Margolis L., Balzarini J. Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication // *Cell Host Microbe*. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 379-89.