

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

На правах рукописи

Маслова Анна Алексеевна

**КОМБИНИРОВАННЫЕ ДЕПО-ФОРМЫ – ПОДХОД К ПОВЫШЕНИЮ
ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Хандажинская Анастасия Львовна

Москва – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4-6
ВВЕДЕНИЕ.....	7-12
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1. Введение.....	13-17
2. Пролекарства аналогов нуклеотидов.....	17-19
2.1. Симметричные диэфиры фосфатов и фосфонатов.....	19-24
2.2. Ассиметричные диэфиры фосфатов и фосфонатов.....	24
2.2.1. Пролекарства CycloSal.....	24-29
2.2.2. Пролекарства HepDirect.....	29-33
3. Фосфорамидаты (ProTides).....	33-40
4. Депо-формы дифосфатов аналогов нуклеозидов.....	40-49
5. Депо-формы трифосфатов аналогов нуклеозидов.....	49-51
6. Липидные нуклеозидные и нуклеотидные пролекарства.....	51-52
6.1. Конъюгаты с жирными кислотами.....	52-58
6.2. Триглицеридные пролекарства.....	58-62
6.3. Пролекарства на основе фосфолипидов.....	62-65
6.4. Пролекарства на основе стероидов.....	65-67
7. Заключение.....	67-68
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	69
1. Синтез липофильных депо-форм.....	70-77
2. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ЦМВ.....	77-81
3. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ВПГ-2/вируса Вакции/вируса Варицелла-Зостер.....	81-86
4. 5-замещённые производные уридина как потенциальные ингибиторы РНК- зависимой РНК-полимеразы коронавируса.....	86-88
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	89
1. Липофильные депо-формы 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина	
1.1. Общая методика синтеза депо-форм 1-4.....	90-91

1.2. Исследование стабильности соединений 1 и 3 в плазме крови кролика.....	92
1.3. Синтез 1,3-пальмитоилпропан-2-она (5).....	92-93
1.4. Синтез 1,3-пальмитоилглицерина (6).....	93
1.5. Синтез 2-(2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин-5'-оксидеканоил)-1,3-дипальмитоилглицерина (7).....	93-94
1.6. Синтез 2-(2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин-5'-карбонил)-1,3-дипальмитоилглицерина (8).....	94-95
2. Гетеродимеры, объединяющие активность против ВИЧ и ЦМВ	
2.1. Общая методика синтеза (3'-азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)алкил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6Н)-ил)ацетатов 11a-f.....	95-98
2.2. Гидролиз соединений 11с и 12с эстеразой печени свиньи.....	98-99
3. Гетеродимеры, объединяющие активность против ВИЧ и вирусов из семейства герпеса и вируса Вакцинии.....	
3.1. Общая методика синтеза производных ацикловира 14a-g.....	99-102
3.2. Общая методика синтеза производных 9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)аденина 15a-d.....	102-104
3.3. Общая методика синтеза производных 5'-нораристеромицина 16a-d.....	104-106
3.4. Гидролиз производных ацикловира и 5'-нораристеромицина эстеразой печени свиньи.....	106
3.5. Синтез 3-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-6-октилфуро[2,3-d]пиримидин-2(3Н)-она (17).....	106-107
3.6. Общая методика синтеза фуранопиримидиновых производных 18a-c.....	107-109
4. Общая методика синтеза 5-замещённых производных уридина 19a-g.....	109-110
ВЫВОДЫ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112-121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ar – арил

Ara-C – цитарабин

AZT – 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин

Bu – бутил

CD₅₀ – цитотоксическая доза, при которой происходит гибель 50% клеток

CDI – N,N'-карбонилдиимидазол

DCI – 4,5 дицианоимидазол

d4T – 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин

DDI – 2',3'-дидезоксиинозин

(-) DIP-Cl – (-)-В-хлордиизопинокамфеилборан

DIPEA – N,N-диизопропилэтиламин

DMAP – 4-диметиламинопиридин

DMSO – диметилсульфоксид

EC₅₀ – концентрация, необходимая для ингибирования активности вируса на 50%

EDCI – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

Et – этил

FDA – Управление по санитарному надзору качества пищевых продуктов и медикаментов США

HMDS – гексаметилдисилазан

HRMS – масс-спектрометрия высокого разрешения

IC₅₀ – концентрация, необходимая для ингибирования активности фермента на 50%

Me – метил

MP – монофосфат

NCS – N-хлорсукцинимид

NMI – N-метилимидазол

PMEA - 9-[2-фосфонометоксиэтил]аденин

Ph – фенил

POC – изопропилоксикарбонилоксиметил
POM – пивалоилоксиметил
Pr – пропил
Py – пиридин
RT – комнатная температура
ЗТС – (-)- β -L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин
TMSOTf – триметилсилилтрифторметансульфонат
Thy – тимин
Ura – урацил
VV – вирус вакцинии
VZV – вирус Варицелла-Зостер
ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВПГ – вирус простого герпеса
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМФА – диметилформамид
ДНК – 2'-дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЦК – N,N-дициклогексилкарбодимид
ЖК – жирная кислота
НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ - ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ОТ ВИЧ – обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека
РНК – рибонуклеиновая кислота
СПИД – синдром приобретённого иммунодефицита
ТГ – триглицериды
ТГФ – тетрагидрофуран
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТФУА – трифторуксусный ангидрид
ТЭА – триэтиламин

ФЛ – фосфолипиды

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦНС – центральная нервная система

УДХК – урсодезоксихолевая кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Инфекционные, в том числе вирусные заболевания являются, наряду с онкологией и сердечно-сосудистыми заболеваниями, одной из основных угроз здоровью человечества. Одним из опаснейших вирусных патогенов является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), в результате постоянной репликации и распространения которого в организме человека развивается синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД). Это клиническое состояние характеризуется существенным уменьшением количества CD4+ Т-лимфоцитов в организме, развитием оппортунистических инфекций и злокачественных опухолей. Согласно последним данным Всемирной Организации Здравоохранения в мире 38.4 млн. человек проживают с ВИЧ. Несмотря на то, что ВИЧ интенсивно изучается почти сорок лет, ежегодно миллионам людей ставится диагноз «ВИЧ-инфекция», а больные продолжают умирать от СПИДа.

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции применяется высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), заключающаяся в одновременном приеме нескольких препаратов, относящихся к разным группам. Существующие на данный момент лекарственные препараты имеют серьёзные недостатки, главными из которых являются токсичность, низкая биодоступность и быстрое возникновение резистентных штаммов вируса, приводящее к необходимости замены препаратов. Таким образом, потребность в поиске новых эффективных антивирусных агентов для терапии ВИЧ сохраняется.

Передача ВИЧ часто происходит на фоне наличия других инфекций, как у доноров, так и у реципиентов ВИЧ. Присутствие последнего в организме также способствует развитию различных коинфекций, чаще всего возбудителями которых могут быть, например, вирусы семейства герпесвирусов - вируса простого герпеса, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса

ветряной оспы. Эти инфекции у иммунокомпетентных носителей часто протекают бессимптомно или с минимальной симптоматикой, но в условиях ослабленной иммунной системы способны наносить существенный вред организму. Иммунологический эффект вирусных коинфекций способствует ускорению репликации вируса, генотипической гетерогенности вируса, снижению выживаемости и значительно увеличивает риск передачи ВИЧ. Сочетание коинфекций и ВИЧ-инфекции трудно контролировать посредством имеющихся лекарственных средств. Современные методы терапии герпесвирусов обладают рядом побочных эффектов и не могут быть использованы в течение длительного времени. Таким образом, создание новых нетоксичных препаратов, способных подавлять репликацию ВИЧ и сопутствующих инфекций является актуальным направлением исследований.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось создание новых депо-форм аналогов нуклеозидов для улучшения фармакокинетических параметров исходных соединений и эффективного ингибирования вирусных мишеней.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- осуществить дизайн и разработать методы синтеза новых липофильных депо-форм 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина; оценить эффективность полученных депо-форм путем исследования фармакокинетических параметров на лабораторных животных;
- осуществить дизайн и разработать методы синтеза новых депо-форм двойного действия (гетеродимеров), обладающих активностью против ВИЧ и коинфекций;
- оценить эффективность полученных депо-форм путем исследования способности высвободить активные компоненты;
- исследовать способность полученных гетеродимеров ингибировать патогены на культуре клеток.

Научная новизна

В работе предложены методы синтеза новых липофильных производных 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина (AZT) с различными линкерами. Изучена их стабильность в плазме крови крысы. Для одного из соединений проведена оценка фармакокинетических параметров в крови кролика и лимфе крысы.

Осуществлён дизайн и синтез четырёх новых типов гетеродимеров, объединяющих компоненты, обладающие противовирусной активностью в отношении ВИЧ и сопутствующих инфекций. Показана их способность высвобождать активные компоненты и проявлять заявленные свойства.

Теоретическая и практическая значимость

Осуществлен дизайн и синтез новых типов депо-форм нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ. Гетеродимеры нуклеозидного ингибитора ОТ ВИЧ и ненуклеозидного ингибитора цитомегаловируса продемонстрировали высокую противовирусную активность и отсутствие цитотоксичности на культурах клеток и коинфицированных тканях, что свидетельствует о перспективности использования этой группы соединений в качестве основы препаратов для терапии ВИЧ и сопутствующих инфекций.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием различных методов органического синтеза и современных физико-химических методов анализа соединений. Выделение и очистку продуктов реакций проводили методами колоночной хроматографии и препаративной тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах с закрепленным слоем силикагеля. Контроль реакций осуществляли методом тонкослойной хроматографии на алюминиевых пластинах с закрепленным слоем силикагеля. Анализ и подтверждение

структур соединений выполняли методами ^1H -, ^{13}C -ЯМР спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения. Противовирусная активность соединений была исследована в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Федеральном научном центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН, Национальном институте детского здоровья и развития человека (США), Институте медицинских исследований Рега (Бельгия).

Положения, выносимые на защиту

Разработан синтез шести новых липофильных депо-форм AZT. Исследование стабильности полученных соединений в плазме крови крысы, а также оценка фармакокинетических параметров в плазме крови кролика и лимфе крысы показало их способность высвобождать AZT.

Осуществлён дизайн и синтез новых групп депо-форм двойного действия, в частности:

- семи гетеродимерных соединений, содержащих нуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ (AZT или 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС)) и ненуклеозидный ингибитор репликации ЦМВ, показана их способность высвобождать активные компоненты под действием эстераз и эффективно ингибировать ВИЧ и ЦМВ в клетках и тканях;

- семи гетеродимеров, содержащих ацикловир и ненуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ, и четырёх гетеродимеров, содержащих 5'-нораристеромицин и ненуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ, обладающих активностью против ВИЧ и герпесвирусов;

- трёх гетеродимеров ненуклеозидного ингибитора ОТ ВИЧ и нуклеозидного ингибитора вируса Варицелла-Зостер.

Предложен метод синтеза шести 5-замещённых производных уридина, в качестве потенциального анти-ковидного компонента депо-форм двойного действия, и исследована их биологическая активность против SARS-CoV-2.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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 -ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения 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.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в ведущих российских и зарубежных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на международных и российских конференциях: Первая школа для молодых учёных по медицинской химии MedChemSchool 2021 (Новосибирск, Россия, 2021), 26th Young Research Fellows meeting (Париж, Франция, 2019), Symposium on HIV and Emerging Diseases (Марсель, Франция, 2018).

Список научных публикаций по теме исследования

1. 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, 25(15), 3350.
2. 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, 189, 169-180.

3. Maslova A. A., Matyugina E. C., Shustova E. Y., Volok V. P., Kozlovskaya L. I., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L. New Analogues of Uridine as Possible Anti-Viral Agents Specific to SARS-CoV-2. *Molecular Biology*. 2022, 56(3), 469-473.

4. Matyugina E., Petushkov I., Surzhikov S., Kezin V., Maslova A., Ivanova O., Smirnova O., Kirillov I., Fedyakina I., Kulbachinskiy A., Kochetkov S., Khandazhinskaya A. Nucleoside Analogs That Inhibit SARS-CoV-2 Replication by Blocking Interaction of Virus Polymerase with RNA. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4),3361.

Объём и структура диссертации

Работа написана на 121 странице машинописного текста и включает 23 рисунка, 23 схемы и 4 таблицы; содержит введение, обзор литературы, обсуждение результатов, описание материалов и методов исследования, выводы, список использованной литературы. Библиографический указатель содержит 97 источников.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Введение

Понятие пролекарства впервые было введено в медицинскую химию Адрианом Альбертом в 1951 году: «Пролекарство - это молекула, которая не обладает биологической активностью, но способна на различных этапах метаболизма создавать биологически активный препарат» [1]. Однако идея пролекарств возникла задолго до этого. Первым веществом, которое соответствует критериям пролекарства, можно считать ацетанилид, используемый с 1867 года как противовоспалительное средство. Впоследствии обнаружено, что его активность вызвана ацетаминофеном, образующимся в результате гидроксирования ароматического кольца, в результате чего ацетанилид был классифицирован как пролекарство [2].

Первым специально разработанным пролекарством был, вероятно, метенамин, поступивший в аптеки в 1899 году. Постоянно растущий интерес к получению и применению пролекарств наблюдается с 1960-х годов. Было подсчитано, что около 10% лекарств, доступных во всем мире, являются пролекарствами, а в 2008 году они составляли 1/3 всех зарегистрированных препаратов с малой молекулярной массой.

Согласно определению Альберта, принятому IUPAC, пролекарство (prodrug) - это любое соединение, которое подвергается биотрансформации до того, как проявит свои фармакологические эффекты. Более узко пролекарства можно рассматривать как лекарственные препараты, содержащие определённые нетоксичные защитные группы, используемые временно, чтобы изменить или устранить нежелательные свойства исходной молекулы. Как правило, метаболическое превращение, необходимое для преобразования пролекарства в лекарство катализируется специфическими ферментами, чаще всего гидролазами, и в идеале оно должно происходить избирательно в целевых тканях для предотвращения побочных эффектов [1].

Есть три основные цели получения пролекарств, которые часто перекрывают друг друга: 1) *фармацевтическая* включает улучшение растворимости, химической стабильности, органолептических свойств (вкус, запах) и уменьшения раздражения и боли в случае препаратов местного применения; 2) *фармакокинетическая* подразумевает улучшение всасывания (в случае перорального применения), ограничение метаболизма препарата, пока он не достигнет своей цели, повышение избирательности доставки лекарства к месту действия, изменение способа транспорта через гематоэнцефалический барьер и увеличение времени распада лекарства; 3) *фармакодинамическая* включает снижение токсичности, улучшение терапевтического индекса, создание препаратов с двумя активными веществами [3].

Все пролекарства можно разделить на два класса, а именно пролекарства с модифицирующим фрагментом и пролекарства-биопрécurсоры. Большинство используемых в настоящее время пролекарств относятся к первому типу, в них лекарственное вещество связано временной ковалентной связью с не обладающим активностью фрагментом. В организме пролекарство подвергается трансформации за счет удаления присоединённого фрагмента, и благодаря этому высвобождается активное вещество. Важно выбрать подходящий модифицирующий фрагмент, который будет защищать активное вещество, сохраняться во время хранения и введения лекарственного средства, а после высвобождения активного соединения, носитель должен подвергаться биодеградации и, разлагаясь на неактивные метаболиты, быстро выводиться из организма. Пролкарства с модифицирующим фрагментом можно разделить на двухкомпонентные, где этот фрагмент присоединен непосредственно к активному веществу, и трехкомпонентные, где носитель связан с лекарственным веществом через линкер [2]. Кроме того, существуют также солекарства (взаимодополняющие лекарственные препараты), являющиеся комбинацией двух активных веществ, которые действуют как модифицирующие фрагменты друг для

друга. При биоконверсии солекарства высвобождают обе активные молекулы в одной и той же целевой ткани [4].

Биопрекурсоры не содержат носителя, и их структура отличается от структуры активного вещества. В связи с этим активация биопрекурсоров основана не на удалении функциональной группы, а на превращении в другое соединение, обычно посредством окисления или восстановления. В результате реакции образуется биологически активное вещество, или в дальнейшем оно превращается в активный метаболит [5].

Нуклеозиды и нуклеотиды участвуют в различных клеточных процессах, таких как синтез ДНК и РНК, клеточная сигнализация, регуляция ферментов и метаболизм. Аналоги нуклеозидов и нуклеотидов представляют собой синтетические, химически модифицированные соединения, которые были разработаны, чтобы имитировать соответствующие природные нуклеозиды, использовать клеточный метаболизм и, после превращения в аналоги трифосфатов, останавливать биосинтез ДНК или РНК. Это имеет потенциальное терапевтическое значение, например, для подавления роста раковых клеток или ингибирования репликации вирусов. Помимо включения в нуклеиновые кислоты посредством взаимодействия с вирусными полимеразами, нуклеозидные и нуклеотидные аналоги могут ингибировать другие ферменты, например, киназы, рибонуклеотидредуктазу, ДНК-метилтрансферазу, пурин и пиримидиннуклеозидфосфорилазу и др. [6].

В 1969 году FDA были одобрены первые препараты на основе нуклеозидов: цитарабин (1-β-D-арабинофуранозилцитозин) для лечения острого миелоидного лейкоза и эдоксудин (5-этил-2'-дезоксинуридин), созданный против вируса простого герпеса, но в дальнейшем не применявшийся [7]. Это положило начало долгой и продуктивной гонке в разработке новых производных нуклеозидов. основополагающая работа Гертруды Б. Элион и Джорджа Хитчингса привела к созданию таких препаратов, как 6-меркаптопурин (азотистое основание) и ацикловир (ациклический аналог гуанозина). Исследования Эрика Де Клерка и

Антонина Холи позволили разработать еще несколько ациклических производных нуклеозидов и нуклеотидов, и по сей день находящихся в клинической практике. В настоящее время существует более 25 аналогов нуклеозидов, применяемых для терапии различных вирусных заболеваний, и 6 аналогов нуклеозидов, одобренных в качестве цитотоксических агентов [7]. Терапевтические аналоги нуклеозидов и нуклеотидов используют те же метаболические пути, что и эндогенные нуклеозиды или нуклеотиды, а также действуют как антиметаболиты. Транспорт аналогов нуклеозидов из желудочно-кишечного тракта в кровь осуществляется пассивной диффузией или активными переносчиками (Na^+ -независимые равновесные переносчики и Na^+ -зависимые концентрационные переносчики). Однако их физико-химические свойства не подходят для пассивной межклеточной кишечной абсорбции. Кроме того, аналоги нуклеозидов не являются природными субстратами и обладают низким сродством к переносчикам нуклеозидов [8]. Следовательно, пероральное всасывание аналогов нуклеозидов часто ограничено. При всём разнообразии аналогов нуклеозидов некоторые, такие как ганцикловир или цидофовир, обладают низкой биодоступностью при пероральном приеме. Другие, например, определённые нуклеозиды, обладающие активностью против ВИЧ, хотя и биодоступны перорально, имеют неоптимальную фармакокинетику. Таким образом, для поддержания терапевтического уровня в плазме крови человека требуются высокие дозы препаратов и их частый приём, что приводит к серьёзным побочным эффектам, таким как апластическая анемия, нейтропения, панкреатит и периферическая невропатия [9].

В клетки аналоги нуклеозидов проникают с помощью специфических переносчиков нуклеозидов, или альтернативными путями, например, используя переносчики органических анионов или катионов, а также переносчики пептидов. Попав внутрь клетки, аналог нуклеозида подвергается первой стадии фосфорилирования нуклеозидкиназой, что приводит к образованию монофосфата. Вторая стадия фосфорилирования

выполняется нуклеозидмонофосфаткиназой, а затем нуклеозиддифосфаткиназа, креатинкиназа или 3'-фосфолицераткиназа катализируют последнюю стадию. Трифосфаты аналогов нуклеозидов могут включаться в нуклеиновые кислоты, конкурируя с природными субстратами, или же прерывать синтез нуклеиновых кислот путем ингибирования ферментов. Рибонуклеотидредуктаза M1 – ключевой фермент, участвующий в метаболизме нуклеотидов, чувствительна к ингибированию как дифосфорилированными, так и трифосфорилированными аналогами. Катаболические ферменты, такие как дезаминазы и 5'-нуклеотидазы, могут снижать количество активных метаболитов [6].

Известно, что три последовательные внутриклеточные реакции фосфорилирования представляют собой затруднительный этап для многих аналогов нуклеозидов. Для большинства аналогов нуклеозидов начальная стадия фосфорилирования является скоростьюлимитирующей [10,11]. Эту проблему можно обойти путем введения моно- или дифосфата аналога нуклеозида. Поскольку полярность приводит к низкой проницаемости и биодоступности, все больше усилий сосредоточено на преодолении этих трудностей путём создания пролекарств нуклеотидов, улучшающих липофильность и высвобождающих исходное соединение в определенном месте. В нуклеотидном пролекарстве, аналоги нуклеозидов обычно ковалентно связаны с молекулой носителя через фосфоэфирную, сложноэфирную, карбоматную или амидную связь. Чувствительность этих химических связей к ферментативному или химическому гидролизу оказывает значительное влияние на активность нуклеотидных пролекарств [9].

2. Пролекарства аналогов нуклеотидов

Поскольку аналоги нуклеозидов структурно отличаются от природных нуклеозидов, их фосфорилирование нуклеозид/нуклеотидкиназами с образованием активных метаболитов часто имеет ограниченную

эффективность. Пролекарства на основе аналогов нуклеотидов были созданы, чтобы обойти это ограничение. Однако такие соединения становятся потенциальными субстратами фосфатаз, катализирующих удаление фосфатной группы. Замена фосфатного фрагмента изостерической и изоэлектронной фосфонатной группой приводит к образованию нуклеозидфосфоната, намного более стабильного, чем соответствующий фосфат. В отличие от связи O-P, связь CH₂-P из-за своей химической природы не подвержена гидролизу фосфодиэстеразами и фосфатазами. Ферментативно и химически стабильные фосфонаты аналогов нуклеозидов, имитирующие монофосфаты нуклеозидов, могут обходить начальное ферментативное фосфорилирование и потенциально быть более эффективными лекарственными препаратами. Подобно нуклеозидмонофосфату, нуклеозидфосфонат может дополнительно фосфорилироваться клеточными нуклеотидкиназами [12,13].

Нуклеозидфосфонаты подразделяются на основные группы: ациклические нуклеозидфосфонаты и циклические нуклеозидфосфонаты.

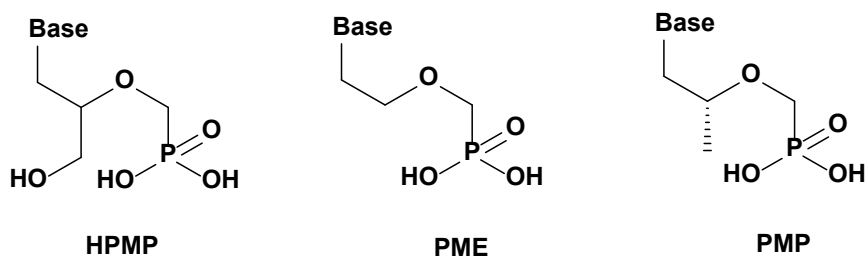


Рисунок 1. Структуры ациклических нуклеозидфосфонатов.

Ациклические фосфонаты, разработанные группой под руководством Холи в 1980-х годах, проявляют широкий спектр активности против ДНК-вирусов и ретровирусов. Их общей структурной особенностью является азотистое основание, присоединенное к алифатической боковой цепи, содержащей фосфометильный остаток. Метиленовый мостик между фосфонатным фрагментом и остальной частью молекулы исключает возможность ферментативного дефосфорилирования. Отсутствие

гликозидной связи в структуре ациклических нуклеозидфосфонатов еще больше увеличивает их устойчивость к химической и биологической деградации. Предполагается, что гибкость ациклической цепи позволяет этим соединениям после дифосфорилирования принимать конформацию, подходящую для взаимодействия с активными сайтами различных целевых ферментов, участвующих в биосинтезе ДНК (ДНК-полимеразы для ДНК-вирусов и обратной транскриптазы для ретровирусов). Дифосфорилированные ациклические фосфонаты имитируют нуклеозидтрифосфаты и, следовательно, могут действовать как терминаторы цепи вирусной ДНК, ингибируя репликацию вируса [13]. В зависимости от структуры ациклические фосфонаты нуклеозидов можно разделить на три различных группы: 3-гидрокси-2-фосфонометоксипропильная (НРМР), 2-фосфонометоксиэтильная (РМЕ) и 2-фосфонометоксипропильная (РМР) (рис.1).

Однако, поскольку молекулы фосфонатов заряжены, диффузия через биологические мембраны при физиологическом рН сильно затруднена. Решением этой проблемы является создание пролекарств, в которых гидроксильные остатки замаскированы защитными группами. Важным условием при таком подходе является обеспечение баланса между достаточной абсорбцией и отщеплением защитного фрагмента без образования токсичных побочных продуктов. Пролекарства фосфонатов можно классифицировать в соответствии с заместителями, которые они включают, на сложные эфиры и амиды, а также по характеру замещения на моно- или дизамещенные производные [14].

2.1. Симметричные диэфиры фосфатов и фосфонатов

Симметричные эфиры не имеют стереоцентра, и обе эфирные группы расщепляются и биологически активируются одним и тем же ферментом или группой ферментов. Описан синтез простых диалкильных эфиров

фосфонатов, однако их стабильность в организмах млекопитающих слишком велика [14].

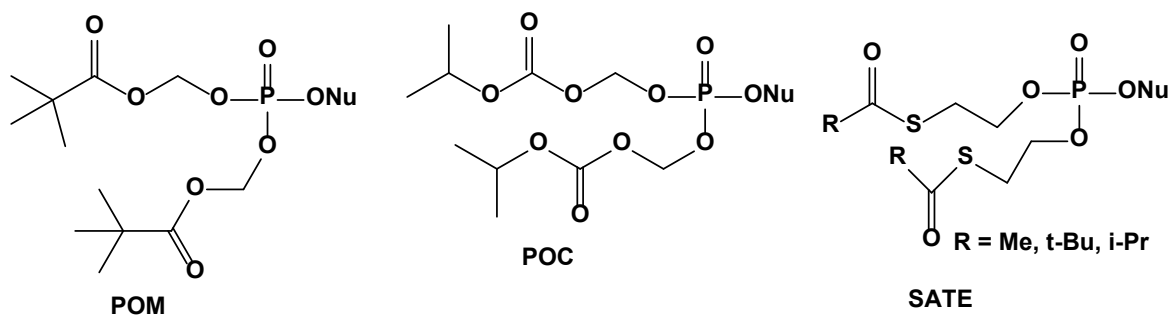


Рисунок 2. Химическая структура бис-РОМ, -РОС, -SATE пронуклеотидов.

Сложные диэфиры фосфорной и фосфоновой кислот более перспективны в качестве пролекарств (рис. 2). Ацилоксиалкильные эфиры с момента их первого использования для защиты фосфомицина в 1969 году были использованы во многих фосфонатсодержащих пролекарствах. Одной из распространенных защитных групп данного типа является пивалоилоксиметильный (РОМ) фрагмент. Пролекарства, содержащие РОМ, ферментативно расщепляются с образованием промежуточного гидроксиметильного соединения, а последующее самопроизвольное отщепление формальдегида приводит к высвобождению моноэфира или активного соединения [15]. Как правило, бис-РОМ производные проявляют в 9-13 раз большую антиретровирусную активность *in vitro*, чем соответствующие им немодифицированные соединения, и демонстрируют значительно увеличенную биодоступность *in vivo* [13].

Впервые о синтезе бис-карбонилоксиметилфосфатных производных нуклеозидов было сообщено в 1984 году. В этом исследовании была также изучена их стабильность в различных буферах и в плазме в присутствии эстеразы печени. Было предложено два способа получения пролекарств **3a** и **3b**: 5'-фторнуклеозида **1a,b** с бис-РОМ-фосфорной кислотой по реакции Мицунобу, или путем замещения 5'-иоднуклеозида **2** бис-РОМ-фосфатом серебра (схема 1). Однако было установлено, что последняя реакция даёт низкий выход, а кроме этого 3'-ацетат не удалось удалить селективно из-за

нестабильности POM-группы в условиях снятия защиты [16]. В 1995 году, учитывая сложности в синтезе пролекарств бис-POM-фосфатных нуклеозидов, Имбах и коллеги разработали новый подход, позволяющий превращать монофосфат нуклеозидов в соответствующий ему бис-POM-монофосфат. Монофосфат азидотимидина реагировал с йодметилпивалатом и диизопропилэтиламином в ацетонитриле в течение 4 дней при комнатной температуре, выход пролекарства азидотимидина составил 22% (на схеме не показано) [17].

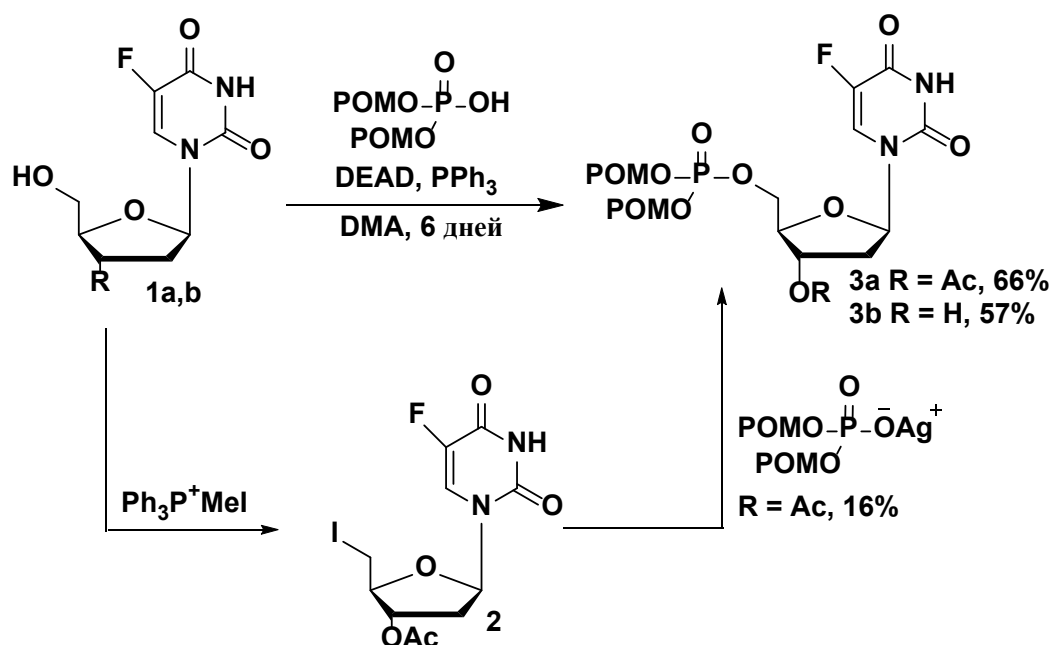


Схема 1. Синтез бис-POM-монофосфата FdU.

Хван и Коул разработали метод синтеза с использованием бис-POM-фосфорохлоридата [18]. Этот реагент был эффективно получен в пять стадий из триметилфосфата **4** путем обработки йодидом натрия и хлорметилпивалатом, последующей монозащитой и хлорированием хлористым оксалилом. Реакция азидотимидина с бис-POM-фосфорохлоридаом **5** в присутствии триэтиламина позволила получить целевой продукт **6** с выходом 47%.

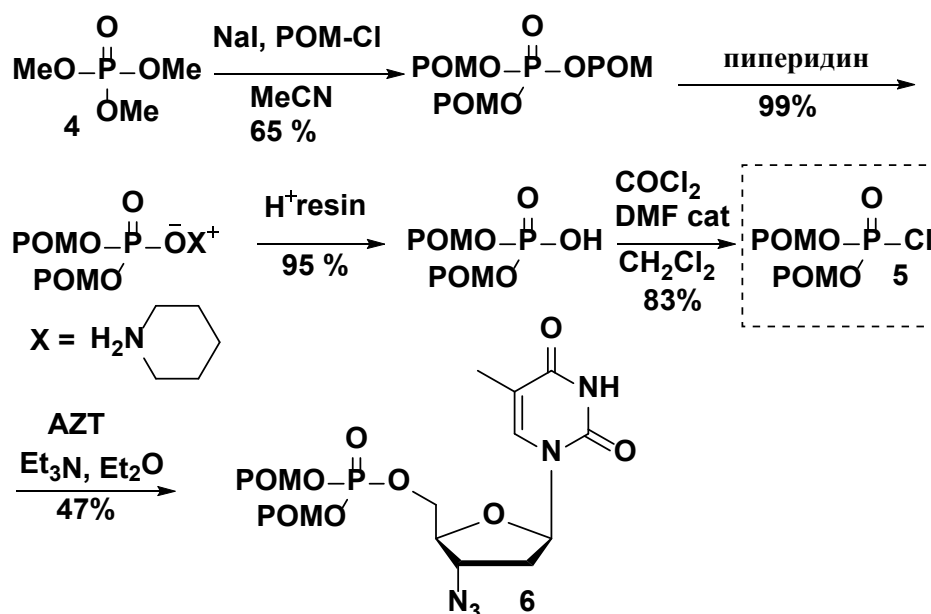


Схема 2. Синтез с использованием бис-РОМ-фосфохлоридата.

В 2002 году бис-РОМ-пролекарство нуклеотида – Адефовир дипивоксил (бис-(РОМ)-РМЕА) **7** было одобрено FDA для лечения гепатита В (рис.3.) [19]. При сравнении с рядом других пролекарств, содержащих различные сложные эфиры, бис-РОМ производное показало самую высокую пероральную биодоступность у крыс, более чем в два раза выше, чем свободной кислоты РМЕА. Улучшение пероральной биодоступности и C_{max} коррелирует со значительным увеличением коэффициента распределения октанол-вода $\text{sLog } P$ с -1,29 до 1,77 [20]. Однако продукты его гидролиза (формальдегид и пивалиновая кислота) токсичны. Было продемонстрировано, что пивалиновая кислота вызывает изменение гомеостаза карнитина. Кроме того, было показано, что бис-(РОМ)-фосфотриэфиры химически нестабильны и очень легко гидролизуются в сыворотке. Эти факторы ограничивают потенциал таких пролекарств для внутриклеточной доставки лекарств [13]. По этим причинам бис-(РОМ)-РМЕА посчитали слишком токсичным для длительного использования в дозировке, необходимой для подавления ВИЧ, и вместо этого он был одобрен FDA только для лечения гепатита В в существенно меньшей дозировке. Фрагмент РОМ продолжают использовать в разработке

фосфонатных пролекарств, и не так давно было показано, что пролекарства, содержащие РОМ, увеличивают проницаемость клеток для противоинфекционных и противоопухолевых агентов [14].

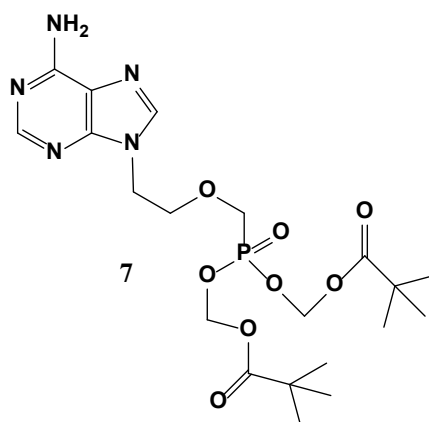


Рисунок 3. Адефовир дипивоксил (бис-(РОМ)-РМЕА).

Родственная стратегия получения пролекарств фосфонатов предполагает использование изопропилоксикарбонил оксиметильных (РОС) производных. Расщепление таких пролекарств эстеразой приводит к высвобождению углекислого газа, формальдегида и 2-пропанола, а не пивалиновой кислоты. Следовательно, в отличие от РОМ-содержащих пролекарств, производные РОС не влияют на уровень карнитина. Было показано, что содержащие РОС ациклические фосфонаты проявляют значительно более высокую активность в отношении ВИЧ-1 при эксперименте на клетках, а также более длительный период полужизни в сыворотке, чем соответствующее соединение РОМ [21]. Одним из успешных примеров применения РОС-пролекарства для лечения вирусных инфекций на практике является препарат тенофовир дизопроксил фумарат (Виреад) **9** (рис.1). Тенофовир **8** сам по себе является гидрофильной и заряженной молекулой из-за присутствия фосфонатной группы, сильно ограничивающей ее поглощение на кишечном уровне [11]. Модификация в сложный эфир фумарата дизопроксила (рис. 4.) понизила гидрофобность молекулы, LogP изменился с 4.13 до 1.25, и позволила улучшить пероральное всасывание. Биодоступность пролекарства при пероральном приеме достигла 20% по сравнению с 1,9% тенофовира, вводимого в свободном виде. Кроме того, в

плазме не обнаружено детектируемых уровней молекул эфира, что свидетельствует о полном высвобождении активного лекарственного средства из пролекарственной формы [22].

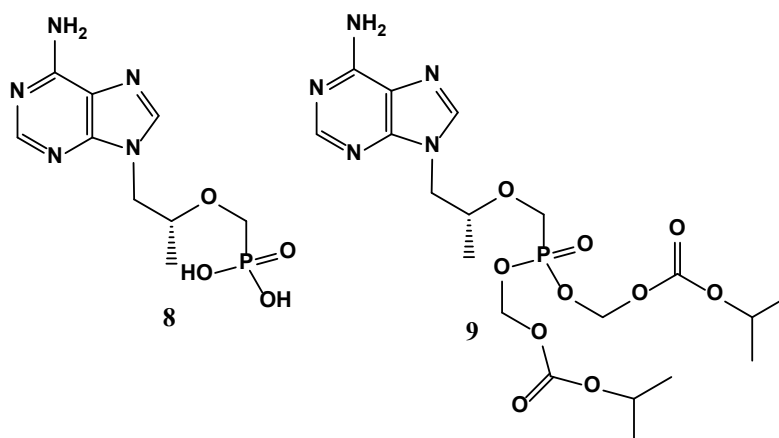


Рисунок 4. Тенофовир и его депо-форма тенофовир дизопроксил фумарат.

2.2. Ассиметричные диэфиры фосфатов и фосфонатов

Если два сложных эфира фосфоната содержат разные заместители, то образуется асимметричный сложный диэфир. В этих соединениях атом фосфора становится хиральным центром, что потенциально усложняет синтез. Однако несимметричные диэфиры позволяют использовать различные стратегии для удаления защитных групп или даже доставку второго лекарственного вещества в клетку, в то время как симметричные диэфиры ограничены единственным способом высвобождения исходного вещества.

2.2.1. Пролекарства CycloSal

Одна из стратегий получения асимметричного сложного эфира заключается в первоначальной маскировке фосфоната салициловым спиртом, она получила название CycloSal (рис. 5). Эта концепция была разработана Крисом Мейром и успешно использована для внутриклеточной доставки ряда противовирусных нуклеозидов. В структуре пролекарств CycloSal салициловый спирт является маскирующей единицей для обоих гидроксильных фрагментов фосфоновой кислоты.

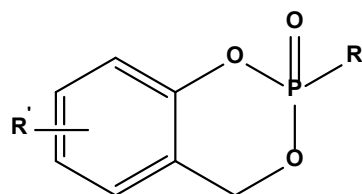


Рисунок 5. Структура CycloSal пролекарства.

Исследовательская группа Мейера всесторонне изучила пролекарства cycloSal и продемонстрировала, что их внутриклеточное расщепление основано на механизме химического гидролиза, полностью управляемого рН, без необходимости ферментативной активации. В основных условиях сначала расщепляется сложноэфирная связь Р-О арильного фрагмента (стадия а, рис. 6), а затем происходит самопроизвольное расщепление связи Р-О бензилового эфира (стадия б, рис. 6) [26]. Было замечено, что при определённых условиях возможна побочная реакция расщепления бензилового эфира (стадия с, рис. 6). Однако дальнейшего химического гидролиза образующегося диэфира фосфата при физиологических значениях рН не происходит.

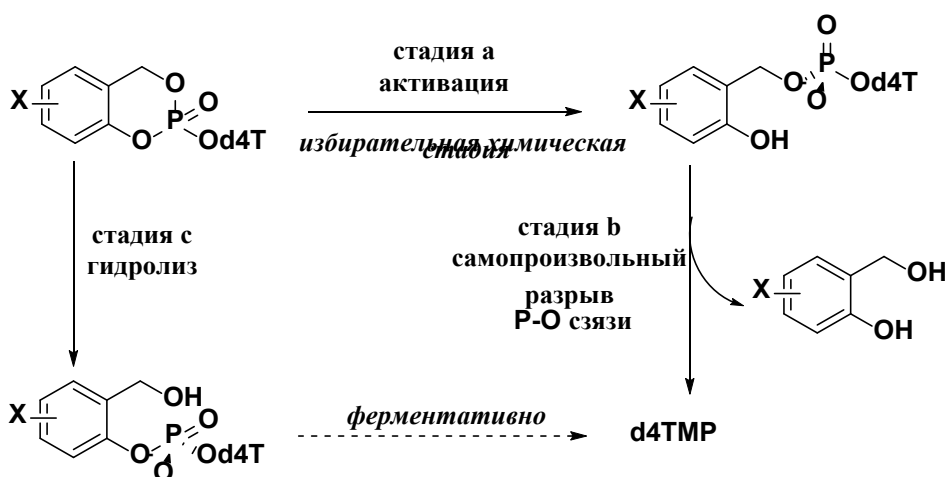


Рисунок 6. Пути гидролиза пролекарства cycloSal-d4TMP.

Поскольку пронуклеотиды cycloSal были разработаны для высвобождения активного лекарственного агента посредством каскадного химического механизма, стабильность и пути гидролиза этих пронуклеотидов можно регулировать изменением природы заместителя в

структуре диола. Различные диолы получали восстановлением коммерчески доступных или синтезированных салициловых альдегидов, кислот или сложных эфиров с помощью NaBH_4 или LiAlH_4 . Другие варианты были получены с использованием орто-формилирования замещенных фенолов с последующим восстановлением или с помощью слабоосновного формилирования непосредственно при гидроксиметилировании. Кроме того, 7-метилированные салициловые спирты были получены путем алкилирования соответствующих альдегидов метиллитием [17].

Первый способ получения *cycloSal* фосфатов основан на связывании нуклеозида с салигенилхлорфосфитом с последующим окислением *in situ* (рис. 7, метод А). Было обнаружено, что оксон является лучшим окислителем, чем *t*-BuOOH или смесь I_2 / пиридин / вода по двум причинам: во-первых, он позволяет количественно окислять триэфиры фосфита до фосфотриэфиров, а во-вторых, неорганические соли оксона легко удаляются экстракцией. Другой путь включает реакцию нуклеозида с фосфоамидитом и затем окисление триэфира фосфита (рис. 7, метод Б). Третья стратегия предполагает реакцию нуклеозида с циклосалигенилфосфорохлоридатом (рис. 7, метод В), а четвертый подход заключается в предварительном синтезе нуклеозидфосфородихлоридата, который затем обрабатывают салициловым спиртом (рис. 7, метод Г). Синтетические подходы с использованием интермедиатов трёхвалентного фосфора являются наиболее распространенными, потому что такие соединения значительно более реакционноспособны, чем соединения с пентавалентным фосфором [27].

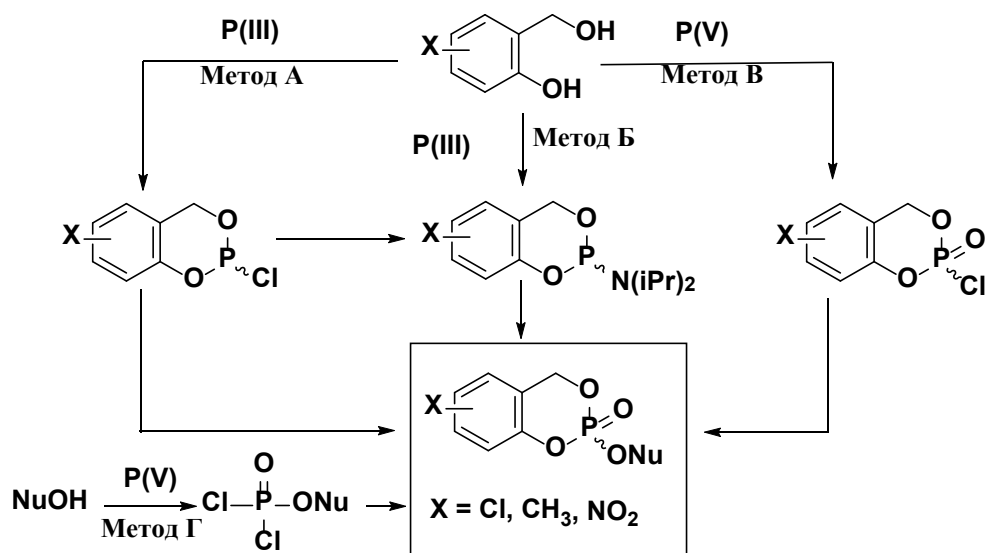


Рисунок 7. Методы синтеза cycloSal-фосфотриэфиров.

Хиральность атома фосфора приводит к образованию смеси двух диастереоизомеров (R_p и S_p) нуклеотидных пролекарств в соотношении близком к 1:1. Хроматографическое разделение этих диастереоизомеров часто является очень сложной задачей, при этом в активности стереоизомеров наблюдается существенная разница. В 2011 году Мейер и его коллеги сообщили о первом синтетическом способе получения стереически чистых cycloSal-пронуклеотидов [28]. Предложенная стратегия была основана на использовании вспомогательных хиральных веществ, которые вводились реакцией оксихлорида фосфора и последующей этерификацией полученного дихлорфосфорамидата салициловым спиртом, что обеспечивало простое разделение диастереоизомеров с помощью хроматографии или перекристаллизации. На последней стадии синтеза нуклеофильное замещение вспомогательного хирального вещества защищенным нуклеозидом давало диастереомерно чистые cycloSal-фосфотриэфиры, поскольку реакция протекает с полным обращением конфигурации атома фосфора. Благодаря контролируемому синтезу стереоцентра и продуманному размещению метильного заместителя в ароматическом кольце можно наблюдать различия в противовирусной активности пролекарств d4TMP в 7-20 раз [29].

Позднее технология cycloSal была применена Мейером и его коллегами и для создания пролекарств ациклических нуклеотидов. Так было синтезировано пролекарство cycloSal-РМЕА и изучена его биологическая активность. Из-за неожиданно низкой гидролитической стабильности этого пролекарства авторам пришлось исследовать более стабильные производные cycloAmb-РМЕА, в которых салициловый спирт был заменен на 2-аминобензиловый спирт. Было показано, что механизм активации циклосульфоната cycloSal идентичен механизму активации циклосульфатфосфата с РМЕА в качестве единственного продукта гидролиза. Производные cycloAmb-РМЕА значительно более химически и ферментативно стабильны, чем пролекарства cycloSal-РМЕА, но их противовирусная активность в 2-3 раза ниже по сравнению с РМЕА и в 10 раз ниже во сравнении с пролекарствами cycloSal-РМЕА. Снижение противовирусной активности приписывают слишком медленному высвобождению РМЕА из cycloAmb-РМЕА, лимитирующей стадией является расщепление промежуточного бензилфосфонатного эфира [30].

Из-за липофильного характера фосфататов cycloSal и их химически запускаемого механизма доставки через клеточную мембрану создается равновесие концентрации лекарственного средства. Чтобы удерживать cycloSal пролекарства внутри клеток и избежать образования равновесия, были разработаны так называемые «запирающие» пронуклеотиды cycloSal [31]. Эти пролекарства предназначены для ферментативного превращения в более полярное соединение внутри клетки. Синтезированные ацилокси-системы, такие как ацетоксиметил, РОС, РОМ, были использованы для высвобождения соответствующих карбоксилатов. Амидосодержащие производные cycloSal были получены также при взаимодействии с различными аминокислотами. Мейером и коллегами был разработан другой тип «запирающих» cycloSal пронуклеотидов, который несет расщепляемые карбоксиэстеразой геминальные дикарбоксилатную или ацетоксивинильную группы, присоединенные к ароматическому кольцу пролекарственного

фрагмента. Такие пролекарства ферментативно превращаются внутри клеток в более полярный альдегид или кетон [32]. Синтез этих соединений (схема 3) начинается с превращения 4-формилсалициловых спиртов **10a-c** в триэфиры **11a-c** *cycloSal* с использованием стандартного метода получения соединений трёхвалентного фосфора. Затем триэфиры **11a-c** взаимодействуют с уксусным ангидридом и хлоридом циркония (IV) с получением целевых пролекарств **12a-c** с выходом 23-45% (схема 3). Интересно, что для некоторых соединений удалось разделить диастереоизомеры (R_p или S_p). Форма S_p пролекарств *cycloSal* продемонстрировала улучшенную противовирусную активность по сравнению с формой R_p [14].

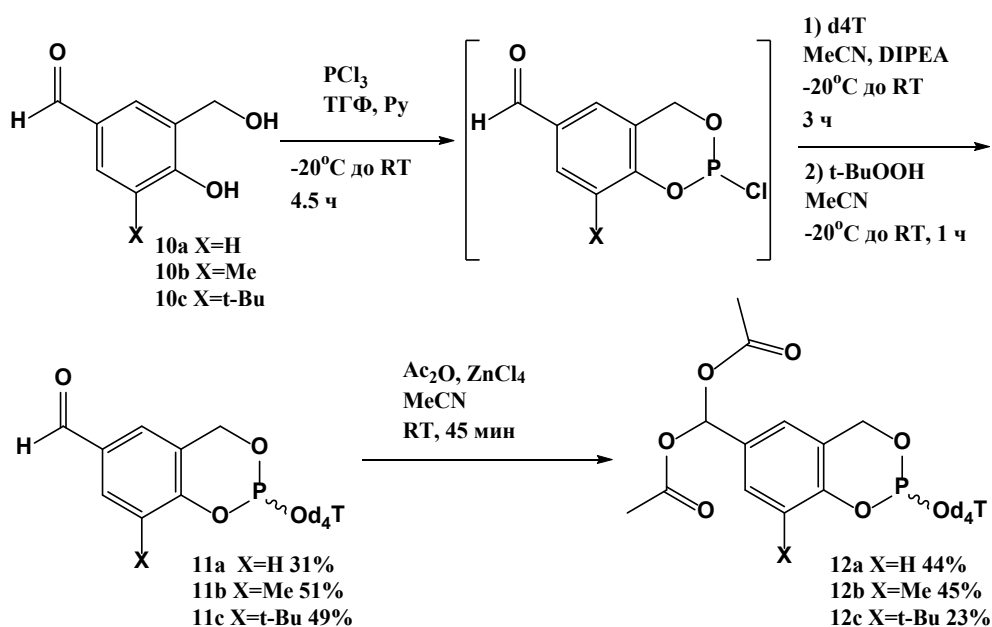


Схема 3. Синтез «запирающих» *cycloSal* пронуклеотидов, содержащих дикарбоксилатные группы.

2.2.2. Пролекарства HepDirect

Очень немногие среди различных фосфатных и фосфонатных пролекарств нацелены на конкретную ткань или орган. Удачным примером такого рода могут служить пролекарства HepDirect, которые преимущественно метаболизируются с помощью ферментов цитохрома P450 в печени и, таким образом, направляются главным образом в печень. Пролекарства HepDirect представляют собой арилзамещенные циклические

1,3-пропаниловые эфиры, разработанные в начале 2000-х годов компанией Metabasis Therapeutics. Эти пролекарства подвергаются окислению в печени ферментами CYP3A. Было обнаружено, что этот процесс зависит от стереохимии и только пролекарства с цис-расположением фосфатной группы и нуклеозида подвергаются воздействию CYP3A. Модификации фенильного фрагмента показали важность наличия электроноакцепторной группы для достаточной химической стабильности. После окисления фрагмент пролекарства быстро раскрывается с образованием монозарядной фосфатной группы, которая впоследствии подвергается β -элиминированию с образованием свободной немаскированной фосфатной группы. Образующийся арилвинилкетон быстро детоксифицируется за счет связывания с глутатионом под воздействием глутатион-S-трансферазы. Благодаря способности этого типа пролекарств активироваться преимущественно в печени, они широко используются в разработке нуклеотидных пролекарств для лечения гепатитных инфекций [13].

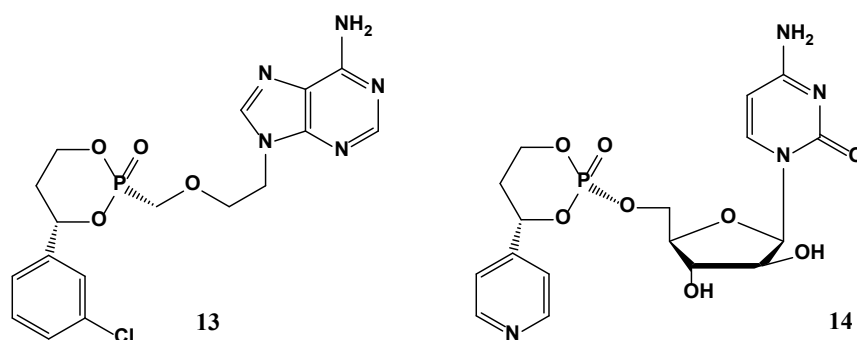


Рисунок 8. HepDirect пролекарства: прадефовир и MB07133.

На сегодняшний день два нуклеотидных пролекарства HepDirect дошли до клинических испытаний: прадефовир **13** и MB07133 **14** (рис. 8). Прадефовир является пролекарством адефовира. Использование стратегии HepDirect в этом случае привело к нацеливанию лекарства на печень, что позволяет избежать побочных эффектов, связанных с нефротоксичностью, которые есть у исходного адефовира. Так, в опытах на крысах прадефовир показал увеличение концентрации РМЕА в печени в 12 раз по сравнению с адефовир дипивоксилем. Поскольку эффективные концентрации

прадефовира в организме поддерживались пероральным приёмом, впоследствии он был исследован в форме мезилатной соли для повышения растворимости в воде. Использование мезилатной соли позволило улучшить биодоступность при пероральном приёме (42%) по сравнению с исходным лекарственным веществом (31%). Прадефовир прошёл фазу I, но дальнейшие клинические испытания были приостановлены в связи с ростом онкологических заболеваний у исследованных животных [33].

MB07133 – это пролекарство HepDirect, которому FDA присвоило в 2007 году статус орфанного лекарства, разрабатывалось в качестве возможного средства лечения гепатоцеллюлярной карциномы. Оно является пролекарством цитарабина, аналога нуклеозида, используемого для лечения острого миелоцитарного лейкоза. Как и для многих других терапевтических нуклеозидов, одним из недостатков использования цитарабина является низкий уровень фосфорилирования *in vivo* с образованием активного метаболита цитарабинтрифосфата. Попытки преодолеть лимитирующую стадию процесса биоконверсии для достижения терапевтических уровней активного метаболита (трифосфата) часто были связаны с миелосупрессией из-за образования цитарабинтрифосфата в здоровых клетках костного мозга [13]. По сравнению с цитарабином, соединение MB07133 генерировало уровни цитарабинтрифосфата в печени в 12 и 19 раз выше, чем в костном мозге и плазме соответственно. В гепатоцитах лабораторных животных, получавших лечение MB07133, не наблюдалось токсичных побочных продуктов гидролиза пролекарства. Данные открытого исследования I / II фазы для оценки безопасности и переносимости показывают, что пролекарство хорошо переносится при непрерывной внутривенной инфузии в дозах до 1800 мг/м²/сутки на протяжении 7 дней у пациентов с неоперабельной гепатоцеллюлярной карциномой, и хотя были отмечены некоторые побочные эффекты, не было доподлинно установлено, что они связаны с данным препаратом [34].

Фосфаты HerDirect могут быть получены путем связывания нуклеозида с фосфорилирующим агентом, полученным из 1-арилпропан-1,3-диола, с использованием диизопропилфосфорамидитного реагента или нитрофенилфосфата. Кроме того, подобные пролекарства можно синтезировать путем прямого связывания 1-арилпропан-1,3-диола с фосфонатным нуклеозидом. Так, прадефовир был первоначально получен путём связывания адефовира с (*S*)-1-(3-хлорфенил)пропан-1,3-диола **17** в присутствии ДЦК в виде рацемической смеси цис- и транс-изомеров **14** (соотношение до 60:40 в пользу цис-изомера), разделяемых хроматографией и фракционной кристаллизацией (схема 4) [17]. Энантимерно чистый (*S*)-1-арилпропан-1,3-диол **S-17** был получен из 3-хлорбензальдегида **15** с последующим хроматографическим разделением диастереомерных (-)-ментонкеталей. Также соединение **S-17** можно синтезировать асимметричным восстановлением арилкетокислоты **16** (-)-В-хлордиизопинокамфеилбораном (DIP-Cl) с последующим восстановлением полученной β-гидроксикислоты с помощью LiAlH₄ с выходом 88%.

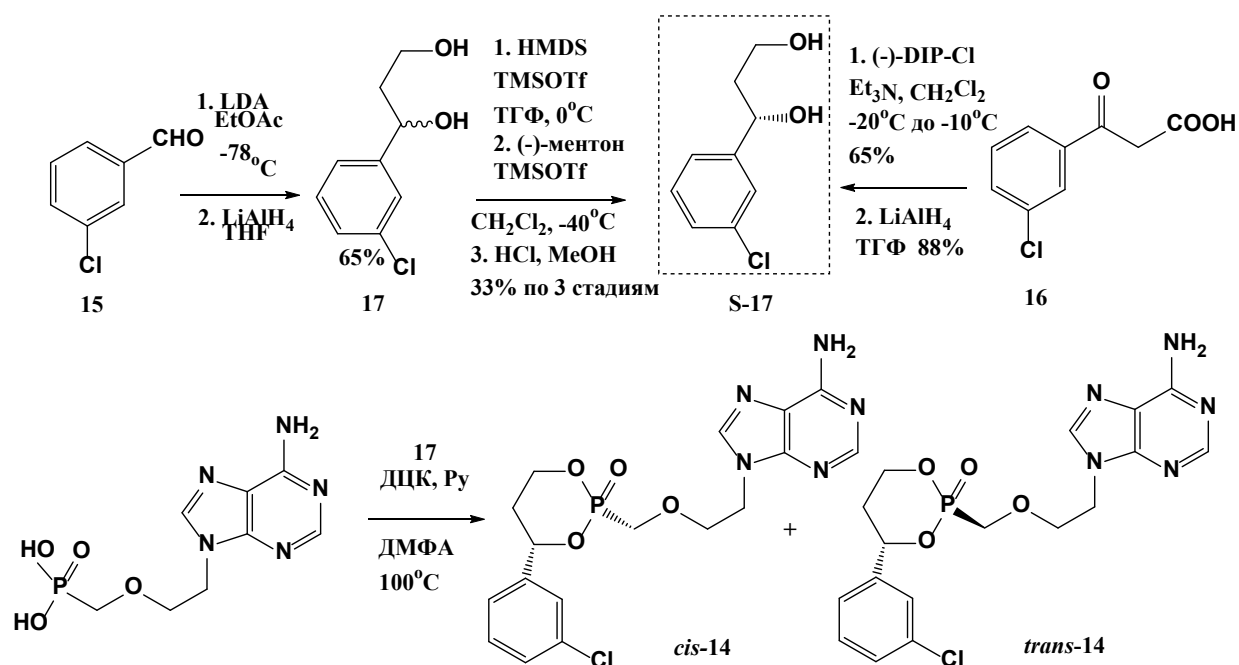


Схема 4. Синтез прадефовира.

С целью получения преимущественно цис-изомера были опробованы другие методы и условия синтеза. Так, Бойер и коллеги установили, что

нуклеофильное замещение активированного бис-хлорфосфоната **19** при низких температурах приводит к образованию цис : транс-изомеров **20** 75:25 (схема 5). В итоге, после снятия защиты с иминной группы уксусной кислотой и очистки с помощью хроматографии выход цис-изомера прадефовира составил 40% по трём стадиям.

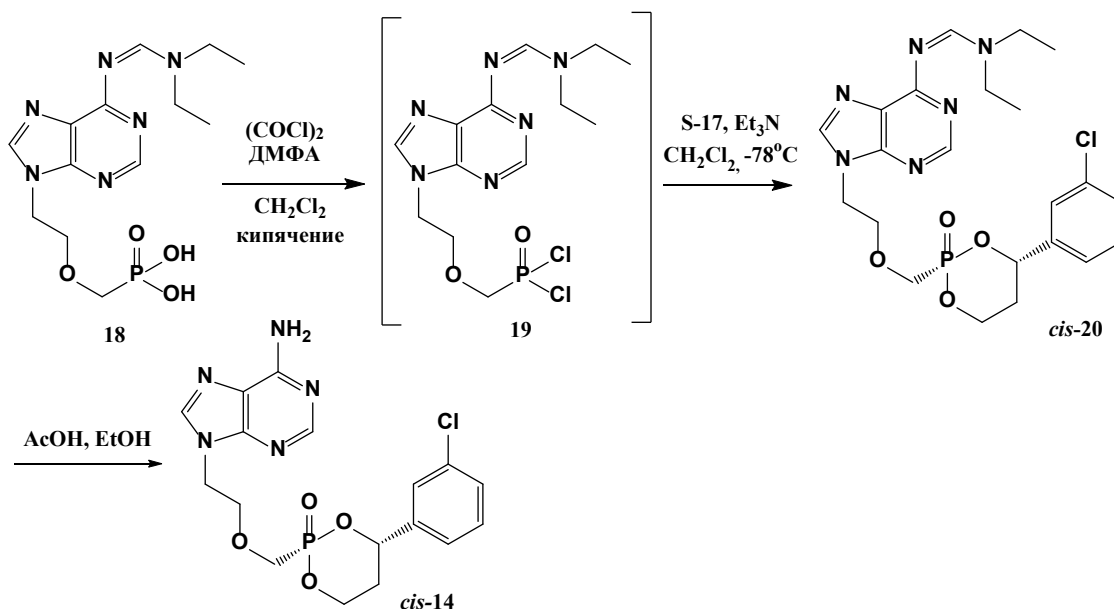


Схема 5. Синтез цис-изомера прадефовира.

3. Фосфорамидаты (ProTides)

Подход ProTide (пронуклеотидный), разработанный Макьюганом и коллегами, был успешно применен к нуклеозидфосфатам, а затем и к нуклеозидфосфонатам. Пролекарство нуклеозидмонофосфата ProTide представляет собой фосфорамидатное производное, содержащее маскирующую группу сложного эфира аминокислоты, присоединенную к арилфосфату нуклеозида P–N связью. Такое пролекарство проникает через клеточную мембрану пассивной диффузией, а при расщеплении теряет две маскирующие группы и высвобождает нуклеозидфосфат внутрь клетки. Предполагается, что метаболическая активация фосфорамидатов идет теми же ферментативными путями, что и активация фосфорамидатов. Механизм активации фосфорамидатов включает в себя стартовый гидролиз

карбокисьного эфира аминокислоты, катализируемый карбоксиэстеразой или карбоксипептидазой, и приводящий к промежуточному соединению (рис. 9). Расщепление сложного эфира сопровождается внутренней нуклеофильной атакой кислотного остатка на фосфорный центр с вытеснением арилокси-группы, которая приводит к образованию пятичленного циклического промежуточного соединения. Этот смешанный циклический ангидрид быстро гидролизуется до соответствующего сложного эфира аминокцилфосфоамидата. Затем происходит расщепление P–N связи сложного эфира под действием фермента, наделенного фосфорамидазной активностью, или в результате простого гидролиза в более кислой субклеточной среде, что приводит к высвобождению активного компонента [35].

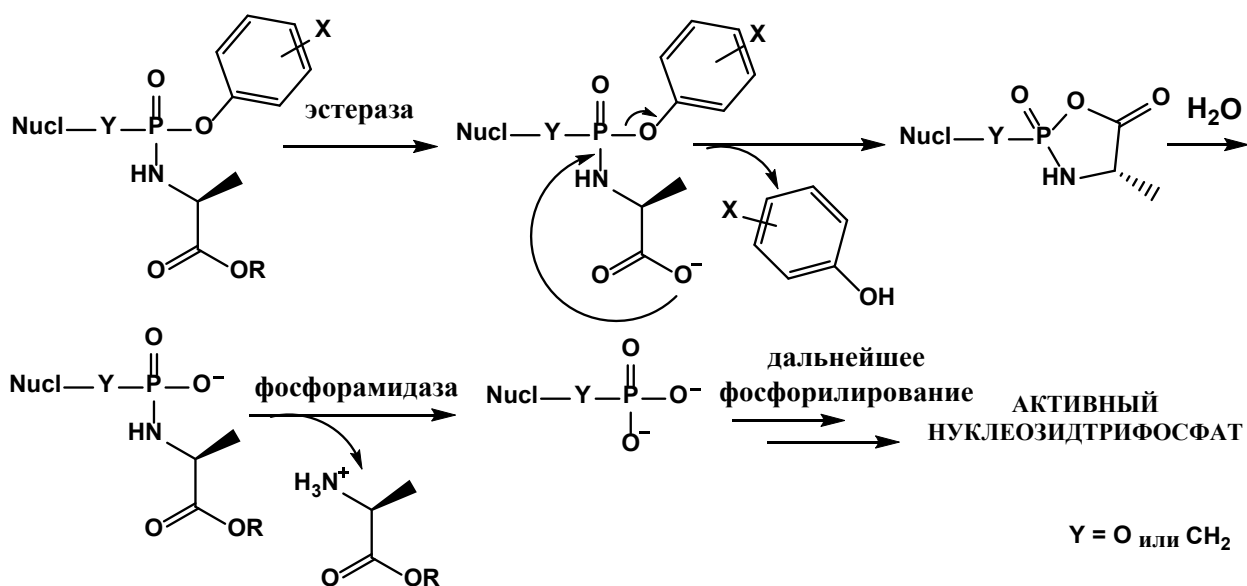


Рисунок 9. Механизм активации пролекарств ProTide.

Аминокислотный фрагмент обычно выбирают из ряда природных и неприродных аминокислот, L-аланин является предпочтительным и присутствует в соединениях ProTide, одобренных для клинического использования. Исследование ProTide пролекарств d4T с β-аминокислотами в фосфорамидатном фрагменте выявило почти полное отсутствие активности против ВИЧ *in vitro* по сравнению с аналогичными производными α-

аминокислот. Обычно используются короткие линейные (метил, этил, пентил) или разветвленные алкилы (изопропил, неопентил) и сложные бензиловые эфиры. Трет-бутильный заместитель не подходит из-за плохой биоактивности. Как правило, в качестве арильного заместителя используют фенил или 1-нафтил, они входят в состав лекарств, применяемых в клинической практике или проходящих клинические испытания. 5,6,7,8-Тетрагидронафтильная группа также показала себя как действенный и эффективный фрагмент. И хотя эффективность пролекарств ProTide зависит от каждой из составляющих фосфорамидатного звена, было доказано, что именно эфир аминокислоты преимущественно управляет противовирусной активностью пролекарств, поскольку определяет стабильность и способность к метаболической активации. Поэтому при поиске оптимальной комбинации маскирующих групп для обеспечения высокой биологической активности обычно проводят исследование зависимости активности от структуры эфирных и арильных фрагментов аминокислот [36].

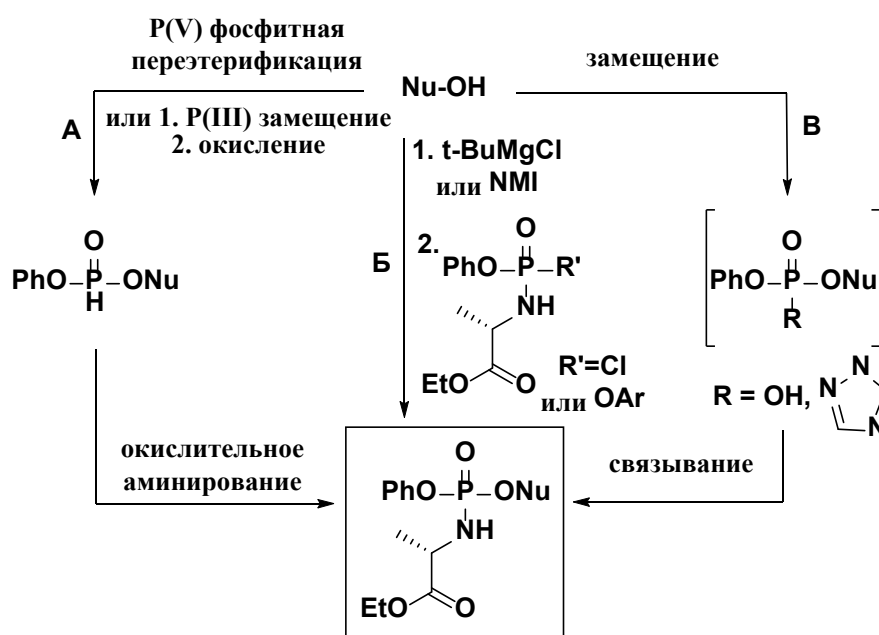


Рисунок 10. Методы синтеза арилоксифосфорамидатов нуклеозидов (ProTides).

Существует три различных стратегии синтеза нуклеозидмонофосфатов ProTide: А) получение нуклеозид арилфосфоната переэтерификацией нуклеозида с диарилфосфитом или замещением с последующим окислением

и дальнейшим окислительным аминированием, Б) связывание нуклеозида с фосфорохлоридатом и В) получение нуклеозидарилфосфата по реакции замещения и связывание его с аминокислотой (рис. 10). Наиболее распространенным является второй способ синтеза. Реакция протекает в присутствии основания: реактива Гриньяра (трет-бутилмагнийхлорид) или N-метилимидазола (NMI). Выбор основания часто определяется преимущественно нуклеозидным субстратом, а точнее количеством гидроксильных групп, которые могут соединяться с фосфорохлоридатом. Например, в рибонуклеозидах обычно используют NMI, и это приводит к образованию в основном 5'-O-фосфоамидатов из-за стерических затруднений и того факта, что NMI более слабое основание, чем t-BuMgCl. Однако в случаях, когда нуклеозид имеет только одну гидроксильную группу, предпочтительным основанием является t-BuMgCl, так как он дает более высокие выходы продуктов. Стоит отметить, что этот подход приводит к получению смеси диастереоизомеров. В некоторых случаях два диастереоизомера ProTide проявляют схожую активность, однако иногда диастереоизомеры могут иметь разные скорости метаболизма и, следовательно, различную эффективность [37]. Например, S_p-диастереоизомер клинически используемого пролекарства ProTide софосбувира (Sovaldi™) демонстрирует 10-кратное увеличение противовирусной активности по сравнению с его R_p-диастереоизомером. В этих случаях становится необходимым разделение диастереоизомеров. Однако разделение их с помощью колоночной хроматографии оказалось серьезной проблемой. Для решения этой задачи была разработана система, позволяющая легко получать и кристаллизовать индивидуальные изомеры фосфорамидирующих реагентов, которые взаимодействуют с нуклеозидами с образованием чистых изомеров ProTide. Было обнаружено, что фосфорохлоридаты с пентафторфенолом являются оптимальными, поскольку желаемый фосфорохлоридат S_p-изомера был легко кристаллизован, стабилен и позволял получать S_p-изомер ProTide нуклеозида [38].

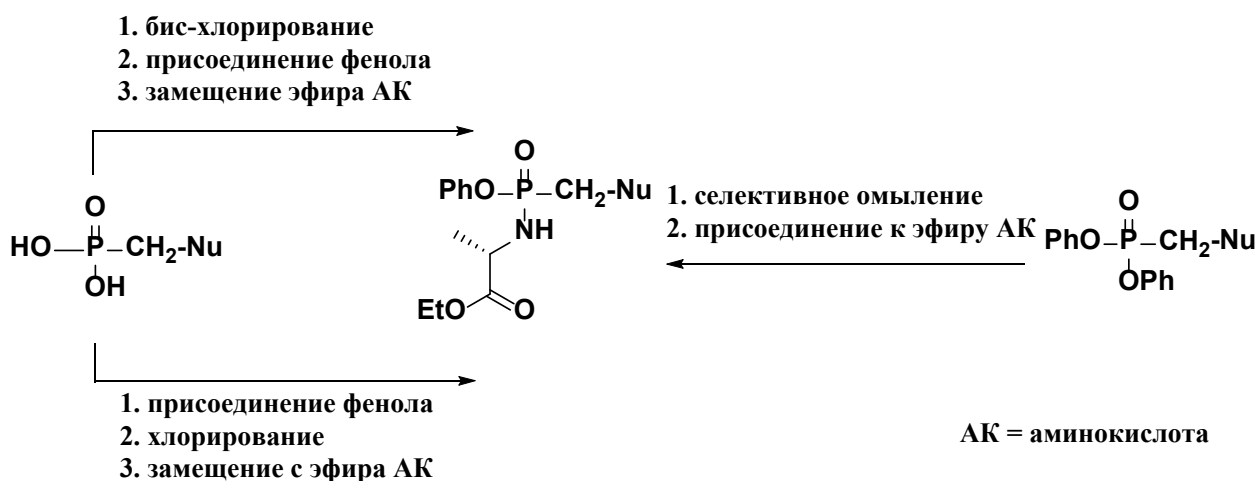


Рисунок 11. Методы синтеза арилоксифосфоамидатов нуклеозидов

При синтезе нуклеозидмонофосфонатов ProTide используют три других синтетических стратегии (рис. 11). Первая стратегия включает бисхлорирование фосфатной группы с образованием дихлоридата монофосфоната. Последующее добавление фенола и сложного эфира аминокислоты в мольном соотношении 1:1 приводит к образованию продукта ProTide. При альтернативной стратегии синтеза монофосфонатную группу сначала связывают с фенольным фрагментом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида, а затем хлорируют продукт реакции. Далее хлор замещается сложным эфиром аминокислоты. Для третьей стратегии синтеза в качестве исходного вещества используют защищённый двумя фенильными группами нуклеозидмонофосфонат. Сначала его подвергают селективному омылению, приводящему к удалению одной из маскирующих фенильных групп. Затем присоединяют образовавшийся продукт к сложному эфиру аминокислоты, получая желаемый ProTide аналог нуклеотида [39].

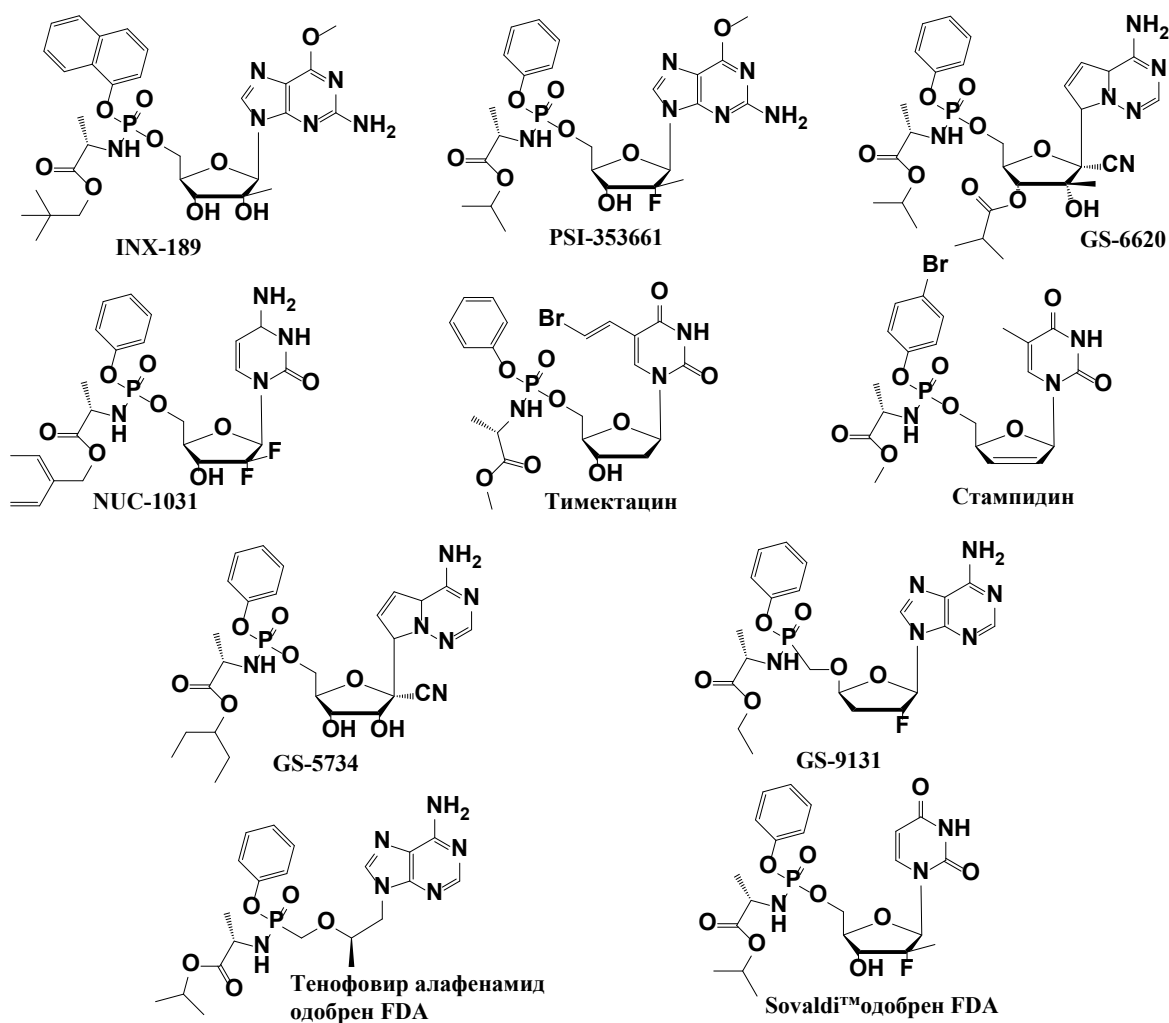


Рисунок 12. ProTide пролекарства, прошедшие клинические испытания.

Как минимум десять пролекарств ProTide дошли до клинических испытаний, а два соединения (софосбувир и тенофовир алафенамид) были одобрены FDA для терапевтического применения (рис.12) [35]. Софосбувир (Sovaldi™) является фосфорамидатным производным 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина. Став лучшим из 50 других разработанных пролекарств ProTides, он был приобретен компанией Gilead Sciences, где получил название Sovaldi и прошел дальнейшие клинические испытания. Было обнаружено, что софосбувир действует путем ингибирования полимеразы NS5В вируса гепатита С – фермента, ответственного за репликацию вирусного генома. Ингибирование этого фермента приводит к обрыву цепи РНК и, в конечном итоге, останавливает репликацию ВГС. Попадая в гепатоциты, софосбувир подвергается последовательному гидролизу

катепсином А и карбоксилэстеразой 1 печени с образованием активного нуклеозидмонофосфата. Дальнейший гидролиз с помощью HINT1 и последующее фосфорилирование приводят к трифосфату, который оказывает ингибирующее действие на полимеразу NS5В посредством терминации цепи РНК [40]. В исследованиях *in vivo* софосбувир показал обнадеживающие результаты. ProTide пролекарство хорошо всасывалось после перорального введения собакам с канюлированной портальной веной, биодоступность составляла 9,9%, что соответствует абсорбции, равной 36%. У людей абсолютную биодоступность не определяли, но абсорбировалось более 80% введенной дозы. Абсорбция была быстрой, максимальная концентрация софосбувира достигалась через 0,5-2 часа после перорального приема. Исследования распределения препарата *ex vivo* показали, что связывание с белками плазмы составляет около 82% у здоровых людей и 85% у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Безопасность софосбувира позже была подтверждена в клинических испытаниях II фазы. Открытое исследование III фазы на одной группе не получавших лечения пациентов, получавших софосбувир вместе с пэгилированным интерфероном и рибавирином в течение 12 недель, показало высокую эффективность софосбувира: 80% пациентов с циррозом и с 92% пациентов без цирроза достигли снижения вирусной нагрузки меньше нижнего предела количественной оценки через 12 недель [41].

Тенофовир аланфенамид (ТАФ) был разработан Gilead Sciences. Это пролекарство ProTide продемонстрировало повышенную анти-ВИЧ активность, более высокую стабильность *in vivo* и обладало меньшим количеством побочных эффектов, чем тенофовир и тенофовир дизопроксил фумарат. ТАФ специфически накапливается в лимфатической ткани и в печени, и поэтому имеет большой потенциал для терапии вируса гепатита В. При использовании ТАФ наблюдают заметно более низкие концентрации тенофовира в плазме и значительно более высокие внутриклеточные концентрации по сравнению с тенофовир дизопроксил фумаратом, что

объясняет меньшую частоту побочных эффектов, таких как потеря минеральной плотности костной ткани и нефротоксичность почек. После клеточного поглощения препарат фосфорилируется в фармакологически активную форму, дифосфат, который является мощным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ. Ингибирование этого фермента приводит к обрыву цепи ДНК, и репликация вируса прекращается. Было продемонстрировано, что ТАФ превосходит тенофовир дизопротексил фумарат не только по своей противовирусной активности, но и в том, что терапевтический эффект может быть достигнут при гораздо более низких дозах, что снижает частоту побочных эффектов. Это пролекарство ProTide было одобрено FDA для лечения ВИЧ-1 в составе комбинированной терапии с другими анти-ВИЧ агентами. А в ноябре 2016 года FDA разрешило однократный приём 25 мг ТАФ для пациентов, страдающих от хронической инфекции HBV [42].

4. Депо-формы дифосфатов аналогов нуклеозидов

Для большинства аналогов нуклеозидов лимитирующей является первая стадия фосфорилирования, однако для азидотимидина (AZT) таковой является вторая стадия - превращение монофосфата AZT в дифосфат AZT. Это приводит к повышенной внутриклеточной концентрации монофосфата, вызывающей побочные эффекты. Использование пролекарств, способных высвободить дифосфат, могло бы исправить эту ситуацию. Причина трудности липофильной модификации дифосфата заключается в химической нестабильности ангидридной связи в пирофосфатном фрагменте. Эта связь стабилизирована только кинетически посредством отрицательных зарядов, предотвращающих нуклеофильные атаки на фосфатные группы. Таким образом, разработка пролекарств дифосфатных производных является более сложной задачей, чем в случае монофосфатов [43].

Хостетлер описал синтез нескольких глицеридных производных дифосфатов. Однако эти соединения не являлись пролекарствами

дифосфатов нуклеозидов, высвобождая в результате распада пирофосфатного фрагмента соответствующие монофосфаты. Группа учёных под руководством Криса Маера предложила другой подход, при котором разные ацильные фрагменты присоединялись к β -фосфатной группе пирофосфатного участка. Метод основан на более быстром расщеплении смешанных ангидридных связей по сравнению с фосфоангидридной связью. Эта концепция была подтверждена исследованиями гидролиза в водных буферных растворах, однако в биологических средах наблюдалось нежелательное разложение полученных пролекарств [44].

Научной группой Маера было решено разработать селективный способ доставки нуклеотидов, основанный на химически индуцированном каскадном механизме. Однако химически обусловленное высвобождение нуклеотида из липофильного предшественника в виде триэфира не так просто, как кажется: в качестве промежуточного соединения образуется заряженный фосфатный диэфир, чрезвычайно устойчивый к дальнейшему химическому гидролизу. Поэтому простые бис-алкил, бис-фенил или бис-бензил триэфиры нуклеотидов не способны высвобождать нуклеотид.

Комбинация двух типов сложноэфирных связей в составе циклического бифункционального маскирующего блока и легла в основу *cycloSal* пролекарств дифосфатов. Для липофильной модификации в нём применялись салициловые спирты, которые были присоединены через фенильную и бензильную сложноэфирные связи, в то время как нуклеозидный аналог присоединен через алкилэфирную связь. Введение трех различных сложноэфирных связей позволяло надеяться на достаточную селективность в процессе гидролиза. Однако после получения нескольких *cycloSal* нуклеозиддифосфатов и исследования их гидролиза с помощью ^{31}P ЯМР-спектроскопии было обнаружено, что преимущественно происходит гидролитическое расщепление пирофосфатной связи с высвобождением соответствующего монофосфата нуклеозида и *cycloSal* фосфата (рис. 13), а нуклеозиддифосфат был обнаружен лишь в небольших количествах [45].

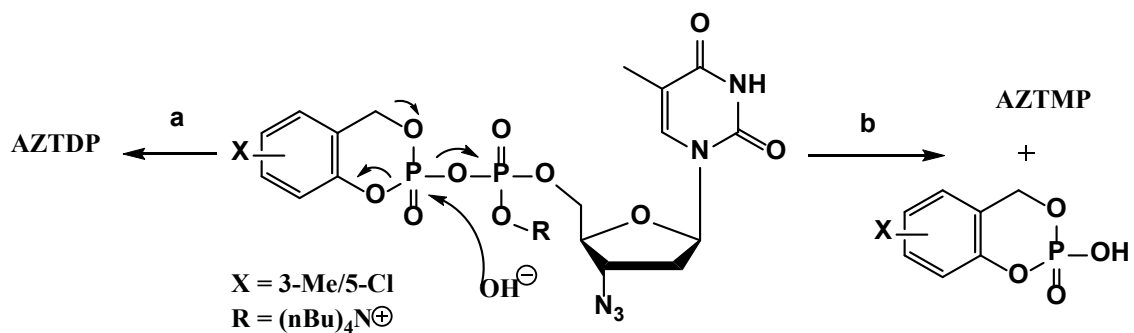


Рисунок 13 . Схема гидролиза пролекарств cycloSal дифосфата AZT.

В связи с этим была разработана новая концепция липофильной маскировки нуклеозиддифосфатов, представляющая собой создание бис-ацилоксибензил-нуклеозиддифосфатов (так называемых соединений DiPPro), обладающих высокой химической стабильностью, но способных к быстрому и эффективному ферментативному превращению в соответствующие дифосфаты в клеточных экстрактах (рис. 14). Подход DiPPro основан на присоединении к β -фосфатной группе нуклеозиддифосфата двух идентичных, замещенных акцепторами бензиловых эфиров. При этом α -фосфатная группа оставляется без маскировки и наличие отрицательно заряженного фосфата приводит к значительной стабилизации пирофосфатного участка. При таком подходе высвобождение нуклеозиддифосфата осуществляется химически или ферментативно (например, с помощью эстеразы или липазы) путем расщепления фрагмента фенилового эфира в маскирующей группе, которое инициирует последующую спонтанную химическую реакцию. Начальное расщепление приводит к инверсии полярности заместителя (акцептор превращается в донор) и, следовательно, к дестабилизации бензилфосфатной эфирной связи (рис. 14). Подвергаясь 1,4-отщеплению и гидролизу, пролекарство разлагается с образованием 4-гидроксibenзилового спирта и монозамещенного нуклеозиддифосфата. Повторение этого механизма приводит к формированию свободного дифосфата [46]. Таким образом, в данном случае не происходит разрыва фосфатной ангидридной связи, что позволяет минимизировать побочные реакции.

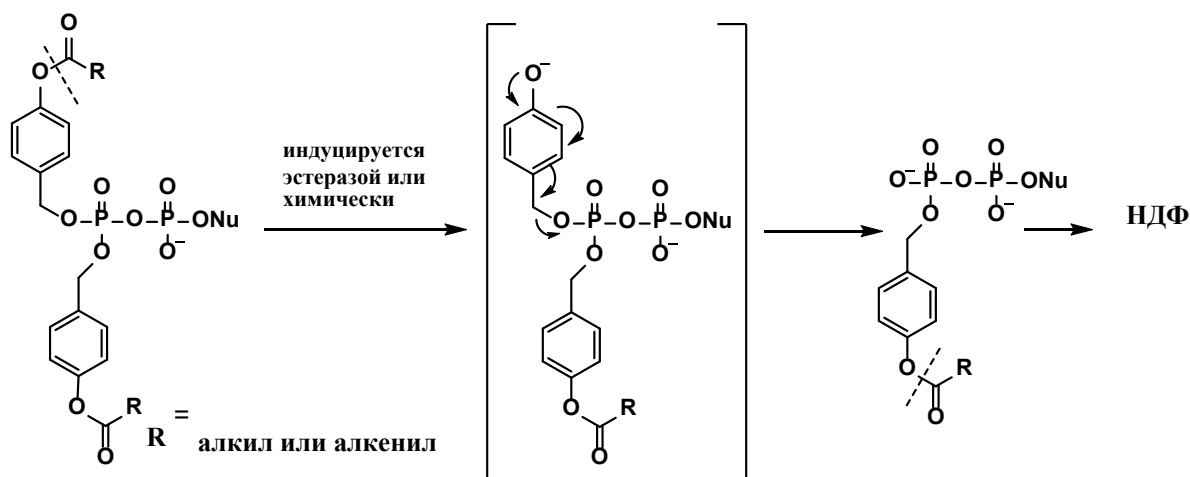


Рисунок 14 . Схема гидролиза DiPPro-соединений.

Синтез соединений DiPPro был осуществлён путем взаимодействия пара-ацилоксибензилфосфорамидитов с бис-тетрабутиламмоний-нуклеозид монофосфатами в присутствии дицианимидазола с последующим окислением трет-бутилгидропероксидом. Затем продукты очищали обращённо-фазовой колоночной хроматографией с помощью градиентного элюирования смесью вода / метанол [44].

Механизм гидролиза полученных соединений был исследован методами ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ и ^{31}P ЯМР-спектроскопии. Полученные данные подтвердили предположенный механизм гидролиза. Время гидролиза половинного количества бис-метилоксибензилдифосфата AZT в PBS составило 17 ч для деградации первой маскирующей группы и 110 ч для отщепления второй маскирующей группы. В процессе гидролиза образовывалось небольшое количество (5%) монофосфата AZT. При инкубации в клеточных экстрактах наблюдалось резкое ускорение реакции расщепления. Время гидролиза половинного количества первой группы сократилось в 500 раз (2 минуты), а второй – в 2500 раз (3 минуты) [44]. Таким образом, эти соединения стали первыми пролекарствами нуклеозиддифосфатов, обладающими высокой химической стабильностью и подвергающимися быстрому и высокоселективному ферментативному расщеплению в клеточном экстракте.

Более детальное изучение пролекарств DiPPro показало, что соединения с короткими или разветвлёнными ацильными заместителями не проявляют противовирусной активности. Это можно объяснить тем, что остаточная полярность этих соединений из-за отрицательно заряженного α -фосфата все еще слишком высока и препятствует эффективному проникновению в клетки. Одним из вариантов решения этой проблемы является повышение липофильности соединений DiPPro. Поэтому были исследованы пролекарства с более длинными заместителями в ацильном фрагменте. При проведении тестов *in vitro* было установлено, что соединения с $R \geq 6$ (см. рис. 14) демонстрируют высокую противовирусную активность [47]. Выяснилось также, что наличие заместителя с длиной цепи $R > 9$ приводило к увеличению химической стабильности и побочной реакции, в результате которой образовывался нуклеозидмонофосфат.

В работе [47] был рассмотрен синтез серии нуклеозиддифосфатов DiPPro, содержащих липофильные, ферментативно расщепляемые бензоилоксибензильные фрагменты. Бензоильная модификация даёт возможность регулировать процесс гидролиза посредством добавления различных заместителей без значительного изменения липофильности, что невозможно при ранее описанной ацилоксибензильной модификации.

Синтез бис-бензоилоксибензилдифосфатов с различными донорными и акцепторными заместителями в четвёртом положении бензоильного фрагмента был произведён на основе фосфорамидитов. Различные 4-бензоилбензиловые спирты были получены с хорошим выходом (до 75%) путем селективного ацилирования 4-гидроксибензилового спирта **21** с использованием бензоилхлоридов **22** при низких температурах. Последующее взаимодействие соединения **23** с N,N-диизопропилдихлорфосфином позволило получить фосфорамидиты **24** с выходами до 90% (схема 6). Мононуклеотид d4T **25** был синтезирован по методу Sowa-Ouchi с выходом 61%. Затем фосфорамидиты, несущие две маскирующие группы, были соединены с мононуклеотидом для образования целевого

пронуклеотида после окисления по аналогии с синтезом ацилоксибензилнуклеозиддифосфатов, выход целевых продуктов составил 33-60% [47].

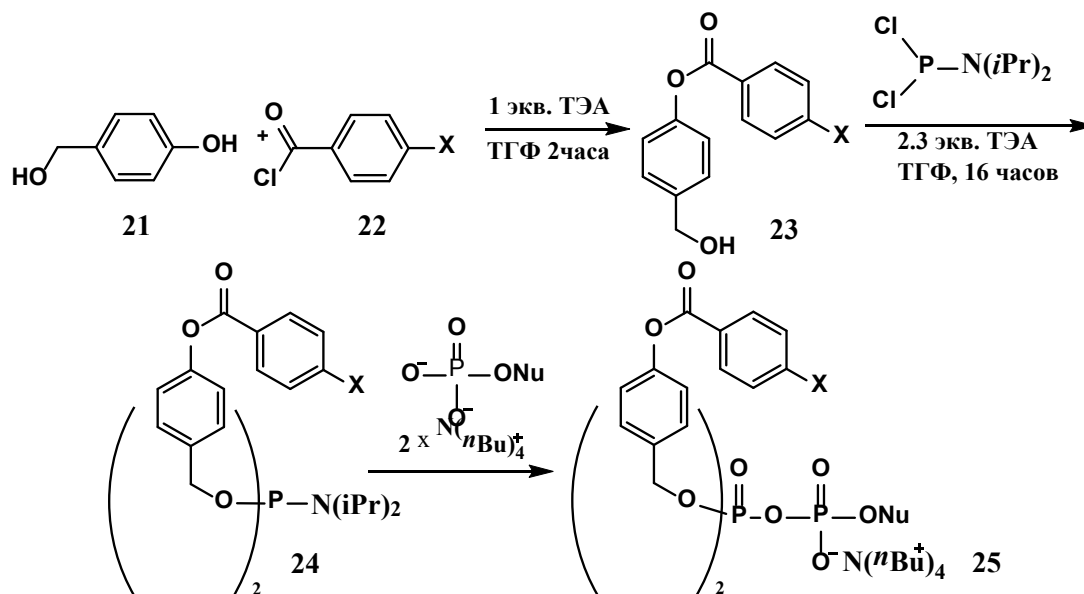


Схема 6. Синтез соединений DiPPro с бензоилоксибензил маскирующим фрагментом.

Дальнейшие исследования показали, что влияние заместителей на липофильность соединений незначительно, но их влияние на стабильность существенно. Также было установлено, что бензоилоксибензилдифосфаты с акцепторными заместителями гидролизуются в фосфатном буфере и в клеточных экстрактах с преимущественным или исключительным образованием нуклеозиддифосфата, тогда как при разложении соединений с донорными заместителями наблюдалось образование и нуклеозидмонофосфата. В тоже время при исследовании противовирусной активности веществ с донорными группами оказалось, что активность в дефицитных по тимидинкиназе клетках в 60 раз выше, чем у исходных нуклеозидов. Это указывает на то, что интактные пронуклеотиды были поглощены клетками и высвобождали внутри клеток фосфорилированное соединение. В случае акцепторзамещенных бис-бензоилоксибензилнуклеозиддифосфатов наблюдалось отсутствие активности, что может быть связано с недостаточной стабильностью [47].

В работе [48] был синтезирован и изучен ряд несимметричных DiPPro нуклеотидов, содержащих две разные маскирующие группы. Была предложена следующая конструкция пролекарства: одна маскирующая группа содержала сложный эфир карбоновой кислоты с короткой алкильной цепью, который, исходя из предыдущих исследований, может быстро расщепляться химически или ферментативно. Вторая маскирующая группа представляла собой сложный эфир карбоновой кислоты с длинным алкильным заместителем или эфир замещенной бензойной кислоты, которые придают молекуле высокую липофильность. Ожидалось, что такая конструкция позволит быстро превращать соединение DiPPro в мономаскированное промежуточное соединение и тем самым избежать побочной реакции с образованием нежелательного нуклеозидмонофосфата. Затем должно происходить отщепление второй маскирующей группы от промежуточного соединения, приводящее к образованию нуклеозиддифосфата с высокой селективностью.

На первом этапе новые несимметричные соединения синтезировали путём ввода двух различных 4-ацилоксибензил-маскирующих групп по аналогии с синтезом симметричных соединений DiPPro. Однако этот вариант не сработал. При новом подходе (схема 7) 4-ацилоксибензиловый спирт **26** обрабатывали трихлоридом фосфора с последующим добавлением двух эквивалентов N,N-диизопропиламина, что приводило к получению бис-диизопропиламинофосфорамидитов **27** с выходом до 56% при реакции *one-pot*. Затем один из диизопропиламиновых фрагментов был заменен вторым 4-ацилоксибензиловым спиртом **28** после активации дицианоимидазолом (DCI), что позволило получить несимметричные фосфорамидиты **26** с очень высокими выходами. Далее проводили активируемое кислотой присоединение фосфорамидитов к нуклеозидмонофосфатам. Сначала выходы этой реакции оказались неожиданно низкими, однако эта проблема была решена путем последовательного добавления небольших количеств раствора DCI. Вначале к реакционной массе, содержащей 1 экв.

нуклеозидмонофосфата и 1,5 экв. фосфорамидита добавляли раствор 0,5 экв. DCI, потом поэтапно порциями по 0,25 экв. вносили DCI каждые 5 минут до суммарного количества 1,25 или 1,75 экв. Полученные DiPPro-нуклеозиды **29** были успешно выделены с использованием автоматической флеш-хроматографии [48].

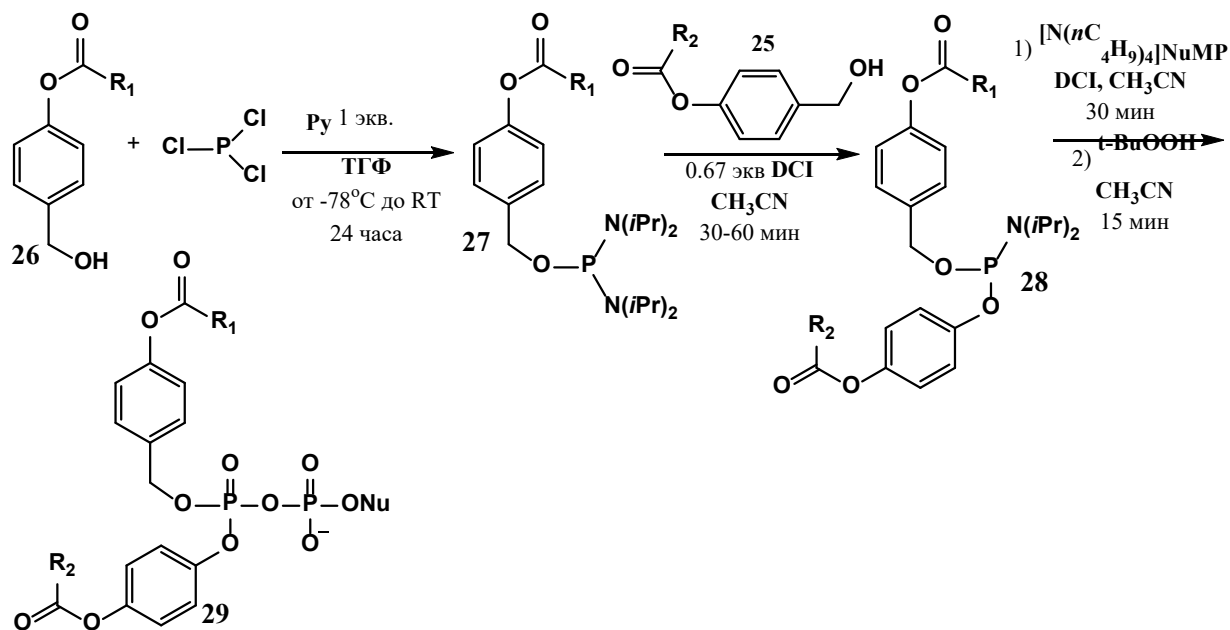


Схема 7. Синтез несимметричных DiPPro нуклеозиддифосфатов.

Исследования гидролиза в фосфатном буфере, клеточных экстрактах и в присутствии эстеразы свиной печени подтвердили высвобождение дифосфата. По сравнению с симметричными DiPPro с двумя идентичными маскирующими группами отношение образуемых нуклеозиддифосфатов к нуклеозидмонофосфатам было заметно выше во всех средах. Большинство несимметричных DiPPro-пролекарств были сравнимы по активности или даже более активными, чем соответствующие нуклеозиды в культурах клеток, инфицированных ВИЧ-1 дикого типа. Исследование антивирусной активности позволило сделать чёткий вывод, что DiPPro-соединения, несущие короткие ацетильные или бензоильные сложноэфирные группы в одном из пролекарственных фрагментов не являются перспективными. Первая сложноэфирная группа расщепляется слишком быстро и

недостаточно липофильная, чтобы обеспечить успешное усвоение, а бензоильный фрагмент также не обладает высокой липофильностью [48]. Тем не менее сама работа по синтезу несимметричных DiPPro-пролекарств доказала успешность и селективность нуклеозиддифосфатной доставки с помощью модифицированного DiPPro-подхода.

5. Депо-формы трифосфатов аналогов нуклеозидов

Разработка нуклеозидтрифосфатных пролекарств является интересным и перспективным направлением, поскольку может позволить обойти все стадии фосфорилирования и максимально увеличить внутриклеточную концентрацию биологически активного трифосфата. Однако ранее считалось, что разработка пролекарств нуклеозидов в форме трифосфатов химически неосуществима из-за низкой стабильности таких соединений. По этой причине нуклеозидтрифосфаты крайне редко использовались в качестве лекарственных платформ из-за ожидаемой плохой доставки и высокой чувствительности к ферментативному дефосфорилированию. Таким образом, литературных данных о синтезе потенциальных депо-форм 5'-трифосфатов аналогов нуклеозидов немного. Трудность, которую необходимо учитывать при разработке таких пролекарств, связана с богатыми энергией фосфатными ангидридными связями в трифосфате. Примечательно, что модификация дифосфатов путем этерификации или замещения γ -фосфатной группы на фосфонатную приводит к заметному увеличению ферментативной стабильности аналога трифосфата. При этом полная липофильная модификация, то есть нейтрализация зарядов, значительно увеличивала бы реакционную способность трифосфатного фрагмента.

Одним из первых подходов к синтезу депо-форм 5'-трифосфатов аналогов нуклеозидов, как и в случае с дифосфатами, стала модификация концевой фосфатной группы ацильным заместителем. В работе [49] приведён синтез нуклеозидтрифосфатов с жирнокислотным фрагментом, который должен был способствовать трансмембранному переносу. На первом этапе

получали ацилпирофосфаты. Далее ацилтрифосфаты **32** нуклеозидов синтезировали с использованием производных фосфоморфолида **31** и полученных ацилпирофосфатов **30** в качестве нуклеофилов (схема 8). Реакция протекала с довольно низким выходом (10-20%). Камфорсульфоновою кислоту добавляли в качестве катализатора и для протонирования высвобождаемого морфолина во избежание аминолиза лабильной ацилфосфатной связи. Оценка гидролиза в триэтиламмоний-ацетатном буфере при физиологическом pH показало, что ацильные производные высвобождают исключительно нуклеозидтрифосфаты, однако на клетках это подтвердить не удалось.

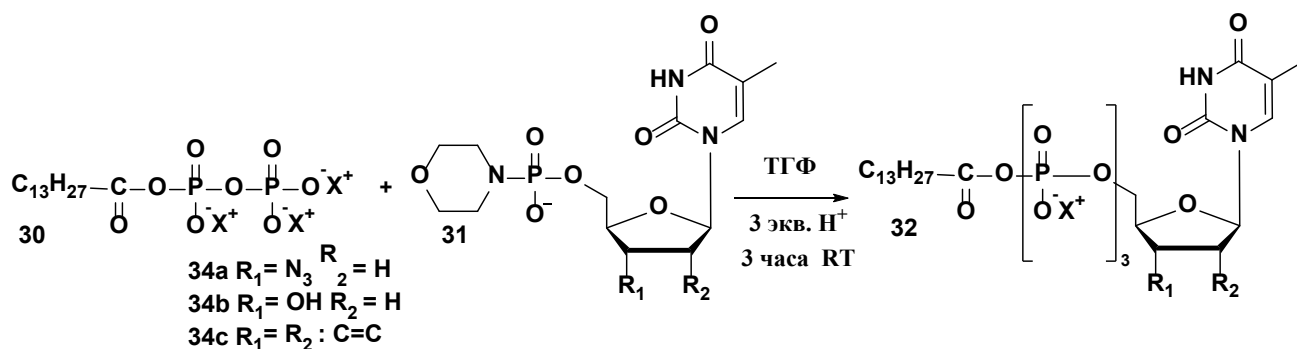


Схема 8. Синтез нуклеозидтрифосфатов, модифицированных жирной кислотой.

В работе [50] был предложен синтез нового пролекарства 5'-трифосфата d4T, которое высвобождает нуклеозидтрифосфат с высокой селективностью. Для достижения этой цели γ -фосфатная группа трифосфата была модифицирована этерификацией с ацилоксибензильными фрагментами, в результате были получены соединения TriPPPPro. Путем варьирования липофильности можно также компенсировать оставшиеся заряды в α - и β -фосфатах. По аналогии с соединениями DiPPPPro распад пролекарства инициируется ферментативным гидролизом фенольного эфира. Эта реакция приводит к спонтанному расщеплению связи бензил-O, в результате образуется первый мономаскированный промежуточный нуклеозидтрифосфат. Этот процесс повторяется для второго ацилоксибензильного фрагмента с образованием конечного трифосфата. Для

модификации были использованы липофильные алифатические эфиры, они позволяют пролекарству проникать в клетку независимо от нуклеозидных транспортеров, но при этом эти маскирующие фрагменты удаляются клеточными эстеразами / липазами. Кроме того, известно, что эфиры жирных кислот поглощаются моноклеарной фагоцитарной системой, клетки которой играют важную роль в патогенезе СПИДа и считаются резервуарами для ВИЧ-частиц.

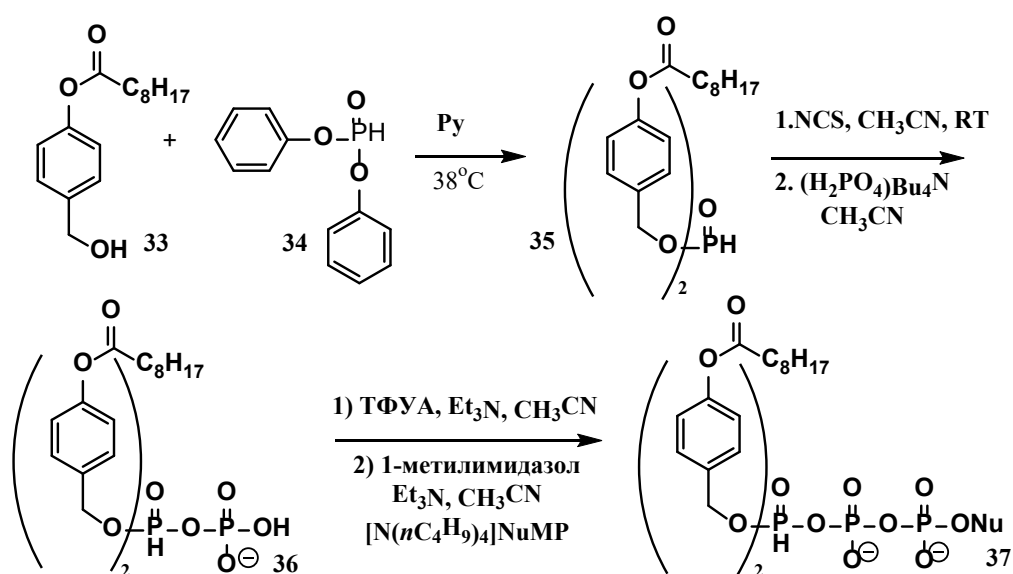


Схема 9. Синтез TriPPPPro депо-форм.

В работе [51] подход TriPPPPro был применён для синтеза депо-форм трифосфатов других нуклеозидов, в том числе и AZT. Согласно ранее описанной методике пролекарства получали путем конденсации нуклеозиддифосфата и фосфорамидита, несущего наноилоксибензильные фрагменты, в присутствии DCI. Для более эффективного превращения исходного нуклеозида в соединение TriPPPPro был разработан альтернативный метод, основанный на реакции нуклеозидмонофосфата и P,P-бис-4-нонаноилоксибензилпирофосфата **36** (схема 9). Преимуществом в данном случае является более легкое получение монофосфата по сравнению с дифосфатом. Для синтеза замещённого пирофосфата сначала проводили реакцию дифенилгидрофосфоната **34** и 4-гидроксиметил-фенилнонаноата **33** в пиридине. Полученное соединение **35** превращали в хлорфосфат

обработкой N-хлорсукцинимидом с последующим фосфорилированием тетра-бутиламмоний фосфатом. Продукт очищали экстракцией, позволяющей выделить Р,Р-бис-4-нонаноилоксибензилпирофосфат **36** с хорошим выходом. Конечную реакцию получения TriPPP_{ro}-нуклеотидов **37** проводили путем ступенчатой активации **36** ангидридом трифторуксусной кислоты и N-метилимидазолом с последующим добавлением нуклеозидмонофосфата. Дальнейшее исследование проникновения соединений TriPPP_{ro} в клетки подтвердило успешное внутриклеточное высвобождение активного трифосфата. Таким образом, подход TriPPP_{ro} можно использовать для преобразования неактивных аналогов нуклеозидов в биологически активные метаболиты, и эта стратегия имеет большой потенциал для использования в противовирусной и противоопухолевой терапии.

6. Липидные нуклеозидные и нуклеотидные пролекарства

Конъюгаты лекарство-липид представляют собой класс пролекарств, в которых активное вещество связано, ковалентно или нековалентно, с липидной частью. В результате метаболических превращений эти соединения высвобождают исходное лекарство и соответствующие производные липидов. Липиды используются из-за таких свойств, как биосовместимость, безопасность, дополнительные функциональные роли в нацеливании лекарств или самосборке и универсальности химической модификации. В основном липидные пролекарства создаются таким образом, чтобы они метаболизировались ферментами, обладающими низкой субстратной специфичностью. Химических связей, которые расщепляются ферментами с высокой субстратной специфичностью, обычно избегают из-за риска насыщения фермента и вариабельности реакции пациента. Ферменты, ответственные за превращение пролекарства в активный компонент, могут присутствовать в крови, печени, желудочно-кишечном тракте и органоспецифических тканях. Основными классами ферментов,

ответственными за биоконверсию пролекарств, являются эстеразы, гидролазы, амидазы, параоксоназы и цитохром P450 [52]. Липиды для модификации выбирают с учетом таких аспектов, как функциональная роль липида, структура лекарственного средства, его стабильность в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), растворимость липидов и образующихся лекарств в ЖКТ. Липиды должны иметь достаточное количество функциональных групп для легкой конъюгации с лекарственным средством. Функциональная роль липидов является ключевым фактором в процессе их выбора для создания пролекарства [53]. Все липиды можно разделить на 4 основных класса: жирные кислоты, стероиды, глицериды и фосфолипиды. Каждому типу пролекарств на их основе присущи свои уникальные свойства, клинические преимущества и недостатки.

6.1. Конъюгаты с жирными кислотами

При разработке пролекарств на основе жирных кислот (ЖК) используются две конфигурации: конъюгация лекарственного средства с карбоксильной группой или с модифицированным ω -атомом ЖК. Взаимодействие карбоксильной группы ЖК с гидроксильными или аминогруппами лекарственного средства обеспечивает стабильную сложноэфирную или амидную связь и представляет собой наиболее выигрышную и распространенную стратегию получения этих пролекарств. Разработка конъюгатов ЖК-лекарство является общепризнанным подходом для достижения таких целей, как предотвращение распада при первичном прохождении через печень, уменьшение раздражения ЖКТ, улучшение химической стабильности исходного препарата и, в некоторых случаях, увеличение направленного транспорта в лимфу [54]. Коротко- и среднецепочечные ЖК попадают в кровь, где связываются с альбумином сыворотки, и затем поступают в печень через воротную вену, а длинноцепочечные жирные кислоты, как правило, повторно ацилируются в триглицериды в энтероцитах, включаются в хиломикроны и попадают в

лимфу. Во многих случаях пролекарства на основе ЖК перед абсорбцией подвергаются полному гидролизу, что предотвращает лимфатический транспорт. Тем не менее, некоторые успехи были достигнуты при создании пролекарств сильнодействующих гормональных препаратов [55].

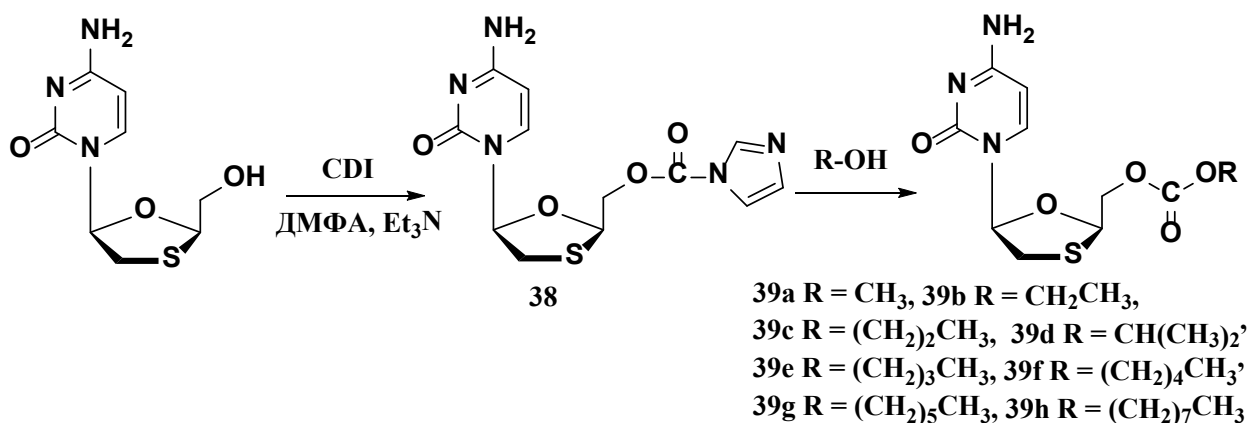


Схема 10. Синтез ЖК-пролекарств ЗТС.

Для улучшения фармакокинетических профилей и эффективности противовирусных средств было получено несколько липофильных пролекарств. Так, Раветти и коллеги разработали ряд 5-О-производных ламивудина (ЗТС) **39**, которые синтезировали путем связывания промежуточного карбонилимидазолида ЗТС **38**, полученного при кипячении ЗТС с CDI в течение 3 часов, с алифатическими спиртами различной длины (схема 10) [56]. Некоторые из полученных пролекарств проявляли сравнимую или даже большую анти-ВИЧ активность по сравнению с ЗТС. В частности, пролекарство **39f** (IC₅₀ = 0,065 мкМ) проявляло примерно в 3 раза более высокую противовирусную ингибирующую активность при тестировании на периферических мононуклеарных клетках крови, инфицированных ВИЧ, по сравнению с исходным ЗТС (IC₅₀ = 0,2 мкМ) [56]. Таким образом, создание пролекарств в виде карбонатных производных представляется возможным подходом для повышения ингибирующей активности терапевтических агентов. Было исследовано всасывание ЗТС и двух пролекарств такого типа **39b** и **39e** в кишечнике. **39b** и **39e** показали в 2

и 10 раз более высокие показатели проницаемости по сравнению с ЗТС. Эти пролекарства очень чувствительны к ферментативному гидролизу и могут генерировать более высокие концентрации ЗТС в клетках [57].

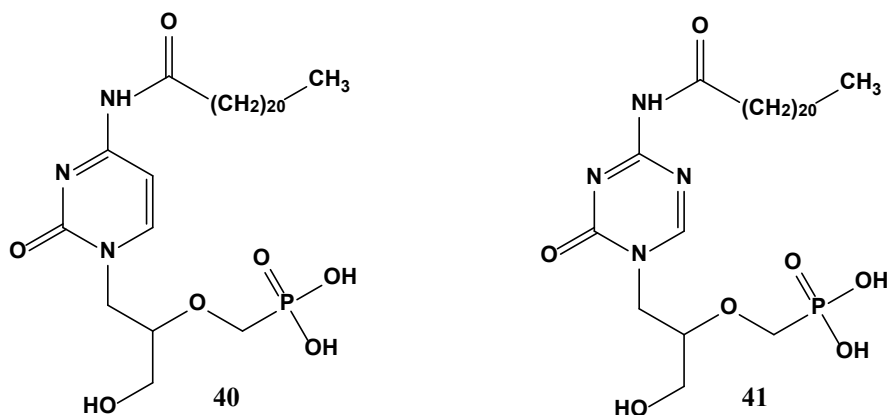


Рисунок 15. Докозаноильные производные цидофовира и его аналога на основе 5-азацитозина.

Был также синтезирован ряд докозаноильных (бегеноильных) пролекарств цидофовира **40** и его аналога на основе 5-азацитозина **41** (рис. 15), и изучена их активность в отношении различных герпесвирусов [58]. Было обнаружено, что наличие свободной фосфоновой кислоты в пролекарстве N4-бегеноил-цидофовире **40** имеет решающее значение для высокой активности и селективности в отношении вирусов герпеса. Однако в ряду N4-ацильных производных 5-азацитозинов свободные фосфоновые кислоты оказались неподходящими пролекарствами из-за их низкой стабильности ввиду деградации триазинового кольца, однако этого эффекта можно избежать посредством этерификации фосфонатной группы.

Нуклеозидный аналог с цитостатическими свойствами цитарабин (Ara-C) имеет низкую биодоступность при пероральном приеме (~20%), что связано с низкой липофильностью и, как следствие, неэффективным проникновением в клетки, а также плохой метаболической стабильностью. Липофильное пролекарство LA-Ara **42**, полученное путём связывания Ara-C с лауриновой кислотой (схема 11), позволило обеспечить более высокую липофильность и проницаемость, а также улучшенную метаболическую

стабильность (аминогруппа цитарабина защищена от дезаминирования). Биологические эксперименты, проведённые на клетках HL60 и K562, выявили значительно более высокую цитотоксичность LA-Ara по сравнению с исходным соединением. Это позволило предположить, что пролекарство обладает заметно более высокой антипролиферативной активностью. После перорального введения крысам данное пролекарство постепенно гидролизуется до Ara-C, и его фармакокинетические параметры значительно лучше, чем у свободного Ara-C: биодоступность, пиковая концентрация в плазме (C_{max}) и период полувыведения Ara-C из LA-Ara были в 32-, 5- и 6,6 раз выше, соответственно [59]. Таким образом, пролекарственный подход обеспечил потенциально более эффективную пероральную альтернативу цитарабина с лучшим терапевтическим индексом для лечения лейкемии.

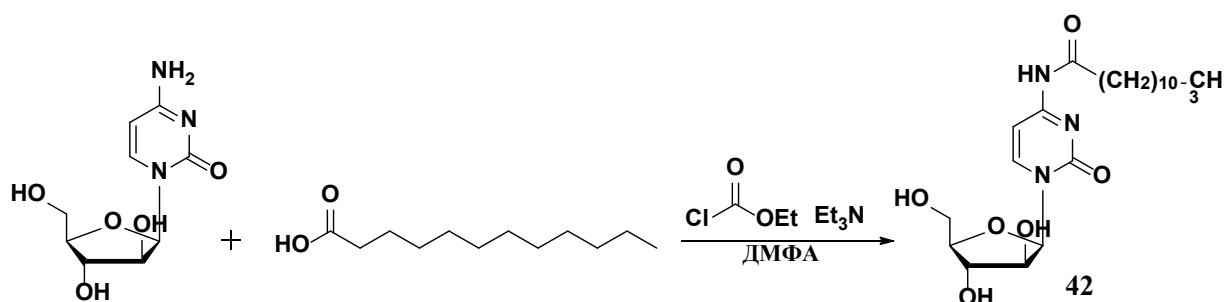


Схема 11. Синтез пролекарства цитарабина на основе лауриновой кислоты.

Ненасыщенные ЖК являются основными составляющими человеческого жира и содержат, по крайней мере, одну двойную связь. По числу двойных связей в алкильной цепи они могут быть мононенасыщенными (наиболее распространенные примеры: олеиновая, элаидиновая кислоты) или полиненасыщенными, которые по положению исходной двойной связи могут быть ω -3 (докозагексаеновая, эйкозапентаеновая кислоты) или ω -6 (арахидоновая, линолевая кислоты). Ненасыщенные ЖК обладают эффектом нацеливания на опухоль, фармакологической активностью и хорошей биосовместимостью, поэтому ряд таких кислот использовали для конъюгации с противоопухолевыми агентами [60].

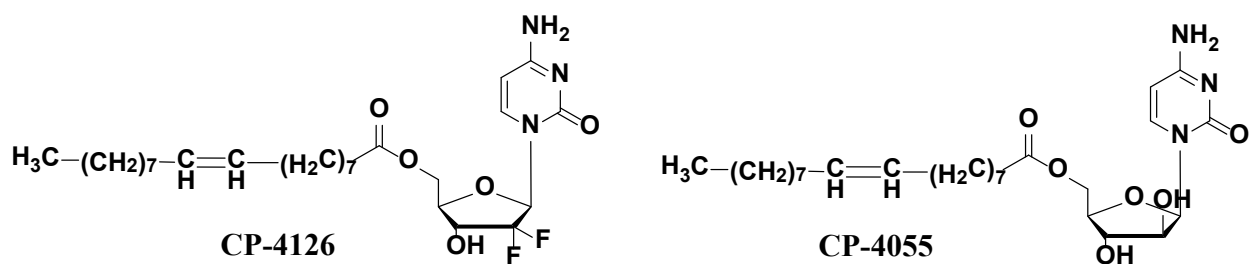


Рисунок 16. Пролекарство гемцитабина CP-4126 и пролекарство цитарабина CP-4055.

Мощный противораковый препарат гемцитабин имеет такие недостатки, как плохое проникновение в клетки и низкая метаболическая стабильность. Для преодоления этих проблем были созданы различные липофильные пролекарства гемцитабина. Производное гемцитабина на основе элаидиновой кислоты (CP-4126) (рис. 16) в клетках BCLO показало противораковую активность примерно в 2 раза выше по сравнению с исходным гемцитабином. Но в клетках лейкемии L5 ингибирующая активность CP-4126 была в 1,7 раза ниже, чем у гемцитабина. Важно отметить, что противораковая эффективность CP-4126 была сопоставима с эффективностью гемцитабина в различных моделях мышей с ксенотрансплантатом человека [61]. Пролекарство цитарабина на основе 5-элаидиновой кислоты (CP-4055, рис. 16) и CP-4126 также помогли преодолеть лекарственную устойчивость, опосредованную изменениями в переносчиках нуклеозидов. Внутриклеточное накопление цитарабина и гемцитабина в клетках SEM после инкубации CP-4055 и CP-4126 было выше по сравнению с исходными препаратами. Дипиридамо́л не ингибировал проникновение пролекарств в клетки, что свидетельствует о том, что эти соединения не являются субстратами переносчиков нуклеозидов [62]. CP-4055 и CP-4126 были высокоэффективны в преодолении резистентности к цитарабину и гемцитабину, вызванной плохим мембранным транспортом нуклеозидов [63]. Кроме того, оба пролекарства продемонстрировали высокую эффективность в отношении различных клеток лимфомы,

устойчивых к цитарабину и гемцитабину. Результаты I стадии клинических испытаний показали, что CP-4055 безопасен и хорошо переносится после внутривенного введения пациентам с солидными опухолями. В 2012-2014 годах была проведена серия клинических исследований для проверки эффективности CP-4055 и CP-4126 у пациентов с широким спектром злокачественных новообразований [63].

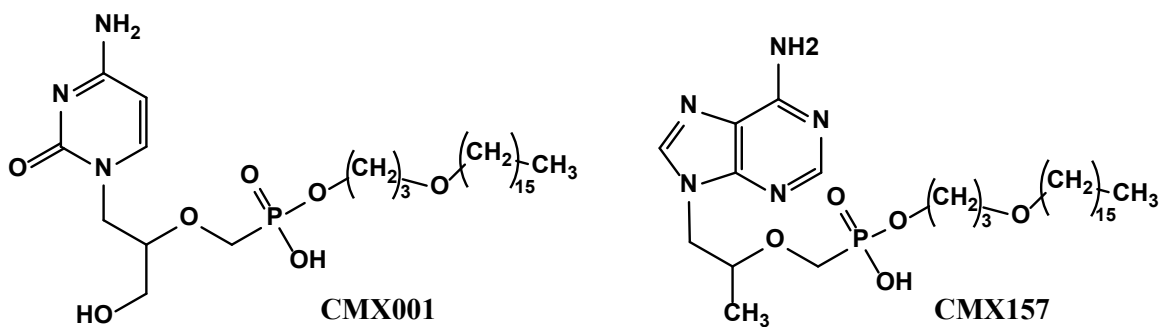


Рисунок 17. Пролекарство цидофовира CMX001 и пролекарство тенофовира CMX157 .

Другим типом липидных пролекарств являются простые эфиры жирных спиртов. Так, например, подобное пролекарство цидофовира CMX001 (1-О-гексадецил-оксипропилцидофовир) было создано для минимизации нефротоксичности (рис.17). В отличие от исходного препарата CMX001 не проявлял каких-либо нефротоксических эффектов. Было установлено, что пролекарство расщепляется фосфолипазой с высвобождением цидофовира. $AUC_{0-\infty}$ (площадь под кривой «концентрация вещества в крови – время») интактного CMX001 и высвобожденного цидофовира составляла 2650 и 1740 нг/мл соответственно. CMX001 ($EC_{50} = 0,04$ и $0,0004$ мкМ) продемонстрировал более чем в 4250 и 1250 раз более высокую противовирусную эффективность *in vitro* по сравнению с исходным препаратом ($EC_{50} = 170$ и $0,5$ мкМ) против вируса Эпштейна–Барр (EBV) и вируса Варицелла-Зостер (VZV) соответственно [63]. На модели сирийских хомяков с иммуносупрессией было показано, что CMX001 способен эффективно снижать аденовирусную нагрузку. Более того, CMX001 показал в 400 раз более высокую противовирусную эффективность ($EC_{90} = 0,31$ мкМ)

по сравнению с цидофовиром ($EC_{90} = 143$ мкМ). Была подтверждена эффективность CMX001 в лечении нефропатии, ассоциированной с ВК-вирусом, у детей младшего возраста, перенесших трансплантацию почки [63]. Все эти результаты указывают на потенциал CMX001 как нового мощного противовирусного средства.

Группа учёных под руководством Ланье исследовала эффективность аналогичного пролекарства тенофовира CMX157 (гексадецилоксипропил тенофовир) (рис.18) против ВИЧ дикого типа и мутантных штаммов. CMX157 был активен против основных подтипов ВИЧ-1 в мононуклеарных клетках периферической крови человека. Значения EC_{50} варьировались от 0,2 до 7,2 нМ для 27 различных штаммов вируса. Противовирусная активность CMX157 в отношении различных мутантных штаммов ВИЧ-1, устойчивых к нуклеозидным ингибиторам ОТ ВИЧ, была примерно в 447 раз выше, чем у тенофовира ($EC_{50} = 19$ нМ и $EC_{50} > 8500$ нМ, соответственно) [64]. Кроме того, CMX157 в концентрации 10 нМ генерировал уровни тенофовирдифосфата как в покоящихся, так и в активированных мононуклеарных клетках периферической крови человека сопоставимые с тенофовиром в концентрации 1000 нМ.

6.2. Триглицеридные пролекарства

В ряде случаев значительные преимущества может иметь направленный транспорт лекарственного средства в лимфатическую систему. Брыжеечная лимфа стекает непосредственно в большой круг кровообращения, и липофильные препараты могут избежать биотрансформации в печени, приводящей к инактивации еще до того, как лекарство попадет в системный кровоток. Лимфатический транспорт может улучшить пероральную биодоступность лекарственных средств и изменить скорость попадания в системный кровоток, обеспечивая контролируемую доставку лекарства [65]. Этот подход можно использовать также для нацеливания на лимфоциты, поскольку 90% лимфоцитов локализованы в

лимфатической системе, причем 50% из них - в лимфе и лимфоидных тканях кишечника.

Лимфатический транспорт лекарств тесно связан с метаболизмом липидов. Переваривание липидов начинается с образования грубой дисперсии в желудке: желудочные/лингвальные липазы гидролизуют исходные триглицериды (ТГ) до диглицеридов и ЖК, которые действуют как поверхностно-активные вещества и стабилизируют эту эмульсию. Ферментативный гидролиз завершается действием панкреатической липазы, которая образует комплекс с колипазой и действует на поверхности эмульгированных липидных капель с образованием соответствующего 2-моноглицерида и двух ЖК. Липофильное лекарство/пролекарство может пройти по этому транспортному пути, связавшись со смешанными мицеллами, образованными амфифильными продуктами липолиза, и тем самым перемещаясь через неперемешиваемый водный слой. Считается, что мицеллы не всасываются в неизменном виде, а позволяют липидам, которые они переносят, проникать в кишечную мембрану для гидролиза и последующего синтеза новых ТГ. Согласно одной из теорий, кислая среда кишечной стенки разрушает мицеллы перед всасыванием моноглицерида, ЖК и лекарственного средства/пролекарства в энтероцит. Оказавшись внутри энтероцита, ЖК, содержащие до 12 атомов углерода, диффундируют через клетку и базолатеральную мембрану в собственную пластинку слизистой оболочки желудка и попадают в порталный кровоток. ЖК, содержащие более длинную углеродную цепь, транспортируются в эндоплазматический ретикулум, где они повторно собираются в ТГ. В этой среде с большим содержанием липидов ТГ образуют липидное ядро липопротеиновой частицы хиломикрона. Именно это ядро хиломикрона связывается с липофильным лекарством/пролекарством и переносит его в лимфатическую систему (рис. 18). Размер липопротеинов (обычно 0,1-1 мкм) препятствует доступу к крови через непрерывный сосудистый эндотелий и вместо этого способствует специфическому проникновению в более проницаемые

капилляры брыжеечных лимфатических сосудов, называемые млечными. Совокупность млечных и подслизистых лимфатических сосудов образует эфферентные лимфатические стволы, а затем грудной проток, содержимое которого попадает напрямую в большой круг кровообращения в месте слияния левой внутренней яремной и подключичной вен, минуя портальную кровь и печень [66-69].

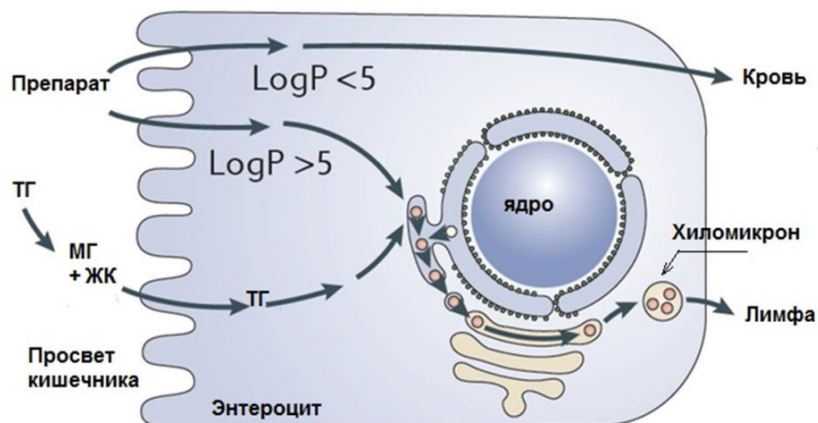


Рисунок 18. Пути попадания веществ в кровь и лимфу после перорального приёма.

Для включения лекарств в кишечные липопротеиды требуется очень высокая липофильность (как правило, $\log P > 5$, растворимость в жирах > 50 мг/г), а она наблюдается лишь у небольшого количества активных соединений [65]. Альтернативным путём может стать получение пролекарств, которые временно увеличивают липофильность и интегрируются в пути переноса липидов из кишечника, что способствует поглощению лимфой, но в итоге высвобождают исходное лекарственное вещество. Одним из таких подходов является создание пролекарств, имитирующих ТГ. ТГ являются основными составляющими пищевых жиров, и пролекарства на их основе используют естественные метаболические пути ТГ для достижения лимфатической направленности, адресной доставки лекарственного средства в отдельные органы (например, ЦНС и печень) или усиленной пероральной доставки лекарственного средства. В пролекарствах с триглицеридным фрагментом активное вещество может быть связано с sn-

1, sn-2 или sn-3 атомом углерода основной цепи триглицерида. Попадая в просвет кишечника, сложноэфирные связи в положениях sn-1 и sn-3 подвергаются селективному гидролизу, оставляя sn-2 моноглицерид доступным для всасывания, поэтому значительное количество пролекарств на основе ТГ содержат лекарственный фрагмент, присоединённый в sn-2 положение [55]. Также при дизайне липофильных пролекарств является важным выбор жирной кислоты с определённой длиной цепи. Так ЖК длиной цепи $> C_{14}$ обычно показывают усиленную лимфатическую абсорбцию (40-60% пролекарства переносится из кишечника в лимфу) и стабильность при циркуляции по сравнению с более короткими цепями [70].

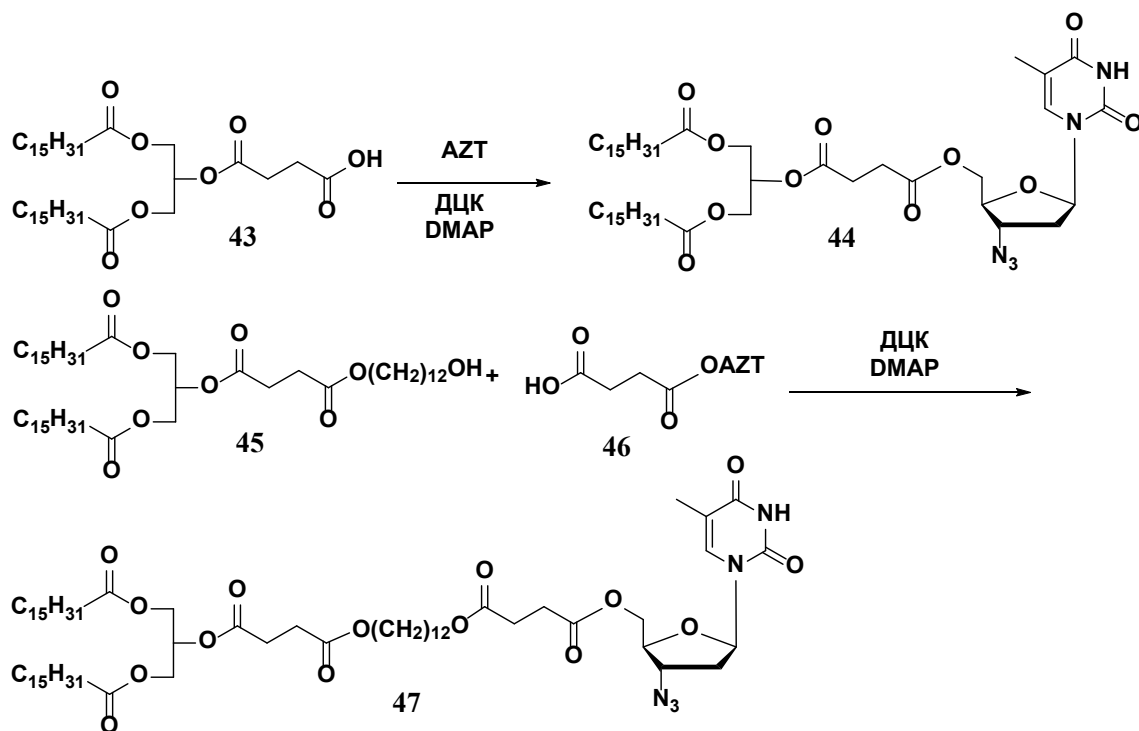


Схема 12. Синтез псевдоглицеридных депо-форм азидотимидина.

В работе [71] были синтезированы псевдоглицеридные депо-формы азидотимидина **44** и **47**, в которых глицериновый остов был соединён с лекарством через линкер, представляющий собой янтарную кислоту (схема 12). Для получения пролекарств осуществляли конъюгацию AZT с триглицеридным фрагментом в присутствии конденсирующего агента N,N-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). С целью улучшения мембранотропных свойств в молекулу соединения **47** был введён спейсер, включающий в себя

остатки длинноцепочечных спиртов. В результате дальнейших экспериментов была показана способность полученных соединений быстро высвобождать активное вещество под действием панкреатической липазы свиньи. Была также исследована их стабильность в различных буферных растворах, которые моделировали значения рН желудочно-кишечного тракта (рН 1.5-2), крови (рН 7.35-7.45) и лимфы (рН 7.35-9). В щелочной среде (рН 9.5) время полугидролиза существенно уменьшалось, тогда как в нейтральной среде вещество было стабильно. На основании этого можно предположить, что соединение **47** легко высвобождать AZT в лимфе.

6.3. Пролекарства на основе фосфолипидов

Содержащиеся в пище и желчи фосфолипиды (ФЛ) попадают в просвет кишечника. Перед абсорбцией фосфолипаза А2 гидролизует жирную кислоту, присоединённую в sn-2 положении, высвобождая абсорбируемые продукты: свободную ЖК и sn-1 лизофосфолипид. После всасывания в энтероциты лизофосфолипид повторно ацилируется в фосфолипид лизофосфатидилхолин-ацилтрансферазой. Эти новые амфифильные ФЛ собираются на поверхности липопротеина и следуют по дальнейшему пути метаболизма липидов [72].

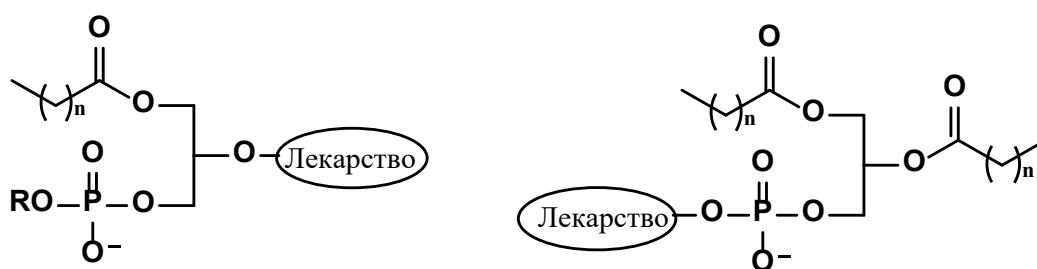


Рисунок 19. Фосфолипидные пролекарства, где лекарство связано с sn-2 гидроксигруппой, либо с фосфатной группой.

В пролекарствах на основе фосфолипидов фрагмент лекарственного вещества может быть связан либо с фосфатной группой, либо прикреплен к глицеридному остову, замещая жирную кислоту, обычно в положении sn-2 (рис. 19). Ранее была более распространена конъюгация гидроксильной

группы препарата с фосфатной группой, позволяющая свести к минимуму гидролиз пролекарства с помощью фосфолипазы А2. Полученный комплекс лекарство-лизофосфолипид может абсорбироваться и следовать путям метаболизма ФЛ. В итоге такое пролекарство может обеспечить изменение фармакологического профиля, более высокую проницаемость гематоэнцефалического барьера и помочь в преодолении множественной лекарственной устойчивости (например, к аналогам нуклеозидов). В последние годы в дизайне фосфолипидных пролекарств получила распространение sn-2 модификация, позволяющая использовать преимущества активации фосфолипазой А2. Секреторная фосфолипаза А2 сверхэкспрессируется при многочисленных воспалительных и злокачественных заболеваниях, и именно в этих случаях такой подход особенно полезен. Поскольку этот фермент не обладает особой селективностью в отношении жирных кислот, разработанные ФЛ пролекарства могут быть восприимчивы к гидролизу фосфолипазой А2 и высвобождать активную часть лекарственного средства в конкретном месте сверхэкспрессии фермента [73, 74].

В работе [75] описан синтез амидоалкильных, оксиалкильных и тиоалкильных эфиров липидов, ковалентно связанных с аналогами нуклеозидов, обладающих активностью против ВИЧ-1, (AZT и диданозин (DDI)) через фосфатные и фосфонатные связи. Амидоалкилглицериновые производные **48a** и **48d** фосфорилировали дифенилхлорфосфатом в пиридине с получением соответствующих фосфатных эфиров **49a** и **49d**. Затем фенильные группы удаляли гидрогенолизом в присутствии PtO₂ с получением **50a** и **50d**. Окси- и тиоэфирные производные **48b** и **48c** фосфорилировали по альтернативной методике с использованием хлорокиси фосфора и триэтиламина или пиридина. Затем производные фосфорной кислоты **50a-d** конденсировали с соответствующим нуклеозидом в присутствии ДЦК, а последующее превращение в натриевую соль дало желаемые продукты **51a-d** (схема 13). Эти соединения показали

hENT1 и сверхэкспрессию белка множественной лекарственной устойчивости (MDR-1)) и эффективны в отношении линии клеток опухоли молочной железы MCF-7, устойчивой к цитарабину. В линии промиелоцитов человека HL60 фармакологическое ингибирование hENT1 дипиридамолом снижало IC₅₀ гемцитабина в 35 раз по сравнению с 4-кратным для KPC34. Также тестирование KPC34 *in vivo* показало, что пролекарство было биодоступным при пероральном введении и эффективным против карциномы легкого Льюиса у мышей, тогда как гемцитабин эффективен только при внутрибрюшинном введении. В модели опухоли на мышях 50 мг/кг KPC34 увеличивали выживаемость так же, как 120 мг/кг гемцитабина. Пролекарство хорошо переносилось и имело существенно улучшенный период полувыведения из плазмы по сравнению с гемцитабином. Всё это позволяет говорить о KPC34 как о перспективном терапевтическом агенте для создания новых цитотоксических препаратов.

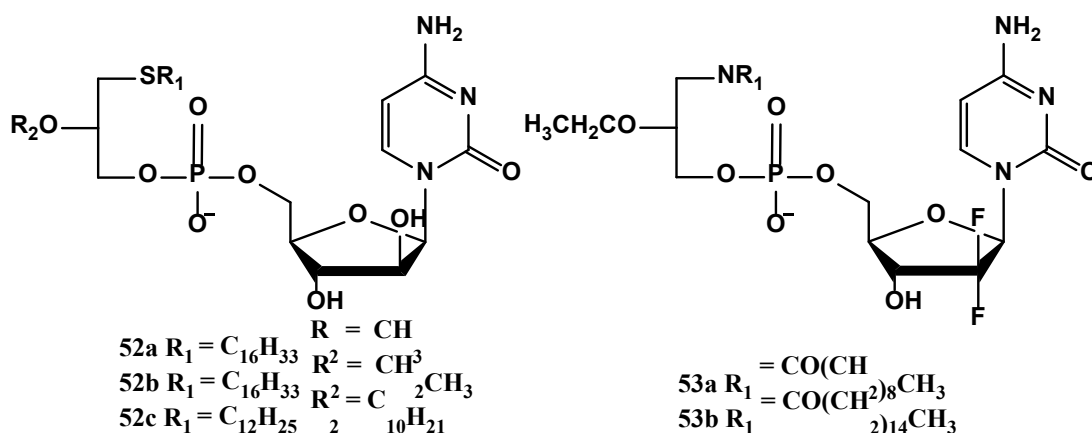


Рисунок 20. Структурные формулы фосфолипидных пролекарств цитарабина и гемцитабина.

6.4. Пролекарства на основе стероидов

Стероиды имеют четырехкольцевую структуру с гидроксильной группой в 3-ем положении сопряжённых колец, которая является наиболее распространенным местом присоединения лекарственного агента. Холестерин служит основным компонентом клеточной мембраны, а также

липопротеинов и предшественником всех стероидных гормонов и играет важную роль, как в физиологических, так и в патологических процессах в организме. Так, низкие уровни холестерина в сыворотке крови связаны с раком толстой кишки, легких, шейки матки, раком молочной железы и лейкемией, тогда как высокие уровни холестерина связаны с некоторыми опухолями головного мозга [78]. Гиперэкспрессия рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в раковых клетках и большое количество холестерина, необходимое для их быстрого роста, позволяют пролекарствам на основе холестерина осуществлять направленный транспорт в раковые клетки и облегчать загрузку лекарств в липопротеины при терапии злокачественных заболеваний. Этот подход был использован для 5-фторурацила: по схеме 14 был синтезирован конъюгат холестерина и 5-фторурацила. Было показано, что полученное пролекарство, загруженное в частицы ЛПНП, связывается с рецепторами ЛПНП и затем поглощается раковыми клетками *in vivo*. Это соединение **54** продемонстрировало более высокую эффективность, чем 5-фторурацил отдельно [79].

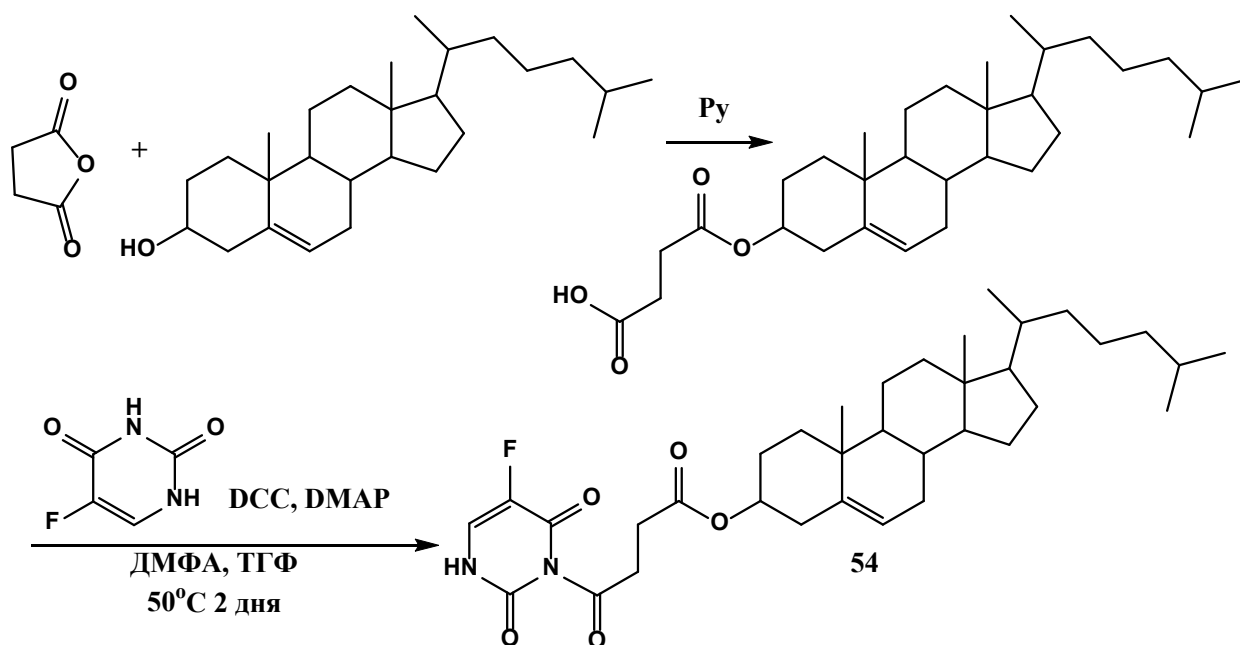


Схема 14. Синтез пролекарства 5-фторурацила на основе холестерина.

Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) представляет собой желчную кислоту, которая способна проникать в центральную нервную систему (ЦНС)

и, подобно холестерину, используется в качестве компонента пролекарств на основе липидов. В отличие от холестерина УДХК содержит три гидроксильные группы, которые доступны для конъюгации с активным фрагментом. Азидотимидин, применяемый в терапии ВИЧ, имеет плохую проницаемость в ЦНС из-за активных переносчиков оттока (efflux). Также затруднительно его попадание во внутриклеточные отделы, где свободный AZT транспортируется из клетки по путям множественной лекарственной устойчивости. Эти недостатки удалось преодолеть путём конденсации AZT с УДХК, которую осуществляли в присутствии ДЦК (схема 15). В результате проведения различных биологических испытаний на плазме, крови, клетках HRPE и крысах было показано, что пролекарство **55** более эффективно в отношении ВИЧ по сравнению с исходным AZT за счет снижения гидролиза в плазме человека, улучшения проницаемости в головной мозг и обход активных переносчиков лекарств [80].

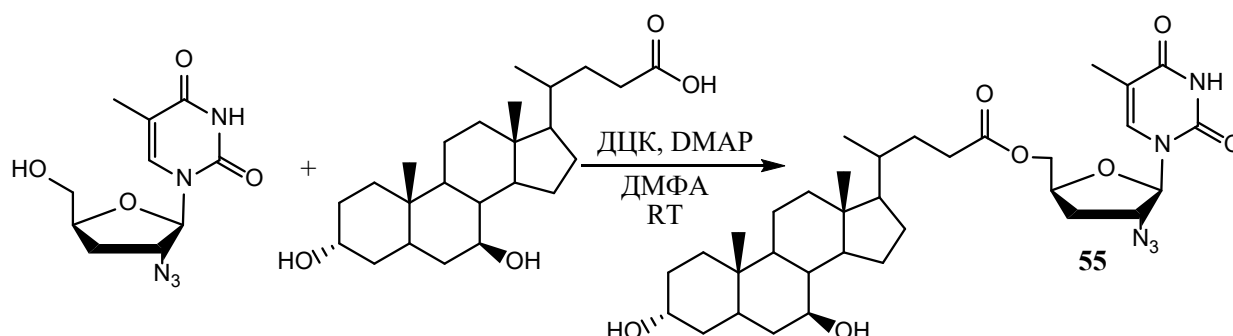


Схема 15. Синтез стероидного пролекарства AZT.

7. Заключение

На протяжении последних десятилетий значительные усилия учёных были направлены на разработку терапевтических агентов на основе аналогов нуклеозидов и их пролекарств. Одной из причин для этого стало появление новых патогенных вирусов, таких как ВИЧ, вирус Эбола, SARS-Cov-2. Различные модификации аналогов нуклеозидов помогают решать широкий спектр задач, таких как улучшение оральной биодоступности, эффективности, направленный транспорт в различные ткани и органы. Так,

создание фосфорилированных аналогов нуклеозидов помогает преодолеть сложности, связанные с внутриклеточным фосфорилированием, маскировка гидроксогрупп позволяет повысить проницаемость через клеточные мембраны, пролекарства HepDirect способствуют доставке лекарства в печень, пролекарства на основе стероидов – в раковые клетки, а пролекарства, имитирующие триглицериды, – усиленному лимфатическому транспорту. Для создания пролекарств аналогов нуклеозидов применяется широкий спектр методов современного органического синтеза. Достижения в создании таких веществ повысили ценность нуклеозидных соединений как противораковых и противовирусных средств. Несколько подобных пролекарственных соединений прошли клинические испытания и были одобрены для применения человеком.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на значительное количество используемых в терапии ВИЧ-инфекции различных анти-ВИЧ препаратов, разработка новых лекарственных средств остаётся по-прежнему актуальной задачей, прежде всего ввиду возникновения резистентных штаммов и наличия серьёзных недостатков у имеющихся лекарств. В частности, фармакокинетический профиль 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина (AZT), первого нуклеозидного ингибитора биосинтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ (ОТ ВИЧ), характеризуется резкими перепадами концентрации препарата в крови. Такие перепады не только вынуждают принимать высокие дозы препарата, приводящие к выраженным побочным эффектам, но и являются причиной возникновения резистентных штаммов вируса. С целью улучшения фармакокинетического профиля AZT в нашей лаборатории ранее был синтезирован Никавир – депо-форма, успешно зарегистрированная в качестве лекарственного средства, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT, проходящий в настоящее время 3 стадию клинических испытаний, а также гетеродимер, содержащий одновременно остатки AZT и ЗТС. Фармакокинетические параметры этих соединений были существенно лучше таковых для AZT.

Данная работа посвящена созданию новых типов депо-форм AZT и состоит из двух частей. Известно, что резервуарами ВИЧ являются CD4+ Т-лимфоциты, находящиеся преимущественно в лимфе и лимфоузлах. В связи с этим первая часть работы описывает создание липид-содержащих пролекарств AZT для обеспечения пролонгированного действия и направленной доставки препарата в лимфу.

ВИЧ угнетает иммунную систему, что повышает восприимчивость к внешним или дремлющим возбудителям. В связи с этим хроническая ВИЧ-инфекция является «болезнью коинфекций» в большей степени, чем другие инфекционные заболевания. Сопутствующие патогены, в первую очередь

вирусы семейства герпеса, вносят свой вклад в подавление иммунитета даже после начала антиретровирусной терапии, именно они являются основным фактором, обуславливающим рост смертности и заболеваемости среди ВИЧ-инфицированных пациентов. На сегодняшний день не существует препаратов, способных эффективно ингибировать ВИЧ и сопутствующие патогены одновременно, поэтому вторым направлением нашей работы стало создание гетеродимеров двойного действия, объединяющих компоненты с активностью против ВИЧ и вирусов из семейства герпеса.

1. Синтез липофильных депо-форм

AZT является первым нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ, одобренным для терапии, и всё ещё активно используется в схемах ВААРТ. Наряду с эффективностью в увеличении выживаемости и снижении заболеваемости оппортунистическими инфекциями, он обладает рядом существенных недостатков. В результате метаболизма в печени, значительная часть AZT (60-70%) реагирует с глюкуроновой кислотой, образуя 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-O-β-D-глюкопирануранозилтимидин, который выводится из организма, не проявив антивирусной активности. Кроме того, только 0,3% препарата переходят в активную трифосфорилированную форму, в связи с чем для поддержания терапевтического уровня препарата возникает необходимость в применении его высоких доз, что приводит к серьёзным токсическим эффектам, таким как анемия, периферическая нейропатия, гранулоцитопения и токсическое действие на костный мозг [81]. Как указывалось в Обзоре литературы, синтез депо-форм, т.е. таких производных лекарств, которые в результате параметаболических или ферментативных превращений в организме, высвобождают активное соединение, является перспективным методом повышения эффективности, улучшения фармакокинетических параметров и снижения токсичности препарата. Одной из задач данной работы было создание потенциальных депо-форм AZT пролонгированного действия

различных типов, для этого была выбрана липофильная модификация. Конъюгация активного вещества с жирными кислотами является общепризнанным подходом для достижения различных целей, таких как уменьшение почечного клиренса за счёт связывания с альбумином плазмы, увеличения химической стабильности исходного препарата и, в некоторых случаях, нацеливание препарата на лимфатический транспорт, способствующий доставке препарата к резервуарам ВИЧ [65, 70, 82].

На начальном этапе работы был осуществлён синтез нескольких липофильных депо-форм AZT. Первый тип представляет собой соединения, в которых один или два остатка AZT присоединены сложноэфирными связями к себаценовой (C₁₀) или субериновой (C₈) кислотам. Такая модификация существенно повышает гидрофобность молекулы и позволяет предположить транспорт AZT в лимфу и его пролонгированное высвобождение.

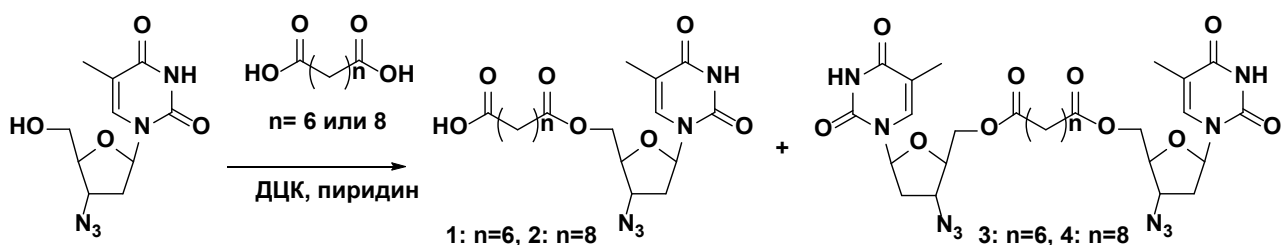


Схема 1. Синтез липофильных депо-форм 1-4.

На первом этапе было осуществлена конъюгация AZT с линкером, представляющим собой жирную кислоту с короткой (C₈) или средней длиной цепи (C₁₀), с помощью конденсирующего агента – дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) (схема 1). Варьирование соотношения реагентов позволило добиться получения преимущественно продуктов моно- или бисприсоединения. Так, в реакции, где AZT, соответствующая кислота и ДЦК были взяты в отношении 1:1:1 в качестве основного получали продукт

моноприсоединения с выходом 30%, а также продукт бисприсоединения с выходом 15%. Изменение количества AZT, кислоты и ДЦК до 3:1:1,5 способствовало увеличению выхода продукта бисприсоединения до 60%, а выход продукта моноприсоединения в данном случае составлял не более 10% (схема 1).

В сотрудничестве с компанией «Ассоциация AZT» была исследована стабильность веществ **1-4** в плазме крови. Для этого аликвоту исследуемого вещества (25 мкл), растворенного в ДМСО с концентрациями 360 или 440 мкг/мл веществ **1** и **3** соответственно, добавляли к 2 мл плазмы крови кролика. Время гидролиза половинного количества вещества **1** составило примерно 40 минут, полностью же оно гидролизовалось до AZT за 2 часа. Для соединения **3** время гидролиза половинного количества составило менее 10 минут, а за 90 минут происходил полный гидролиз до AZT и вещества **1**. Аналогичные данные были получены для соединений **2** и **4**. Полученные результаты показывают, что созданные депо-формы довольно быстро высвобождают AZT под действием ферментов плазмы крови и нуждаются в дополнительной модификации.

Таблица 1. Гидролиз соединений **1** и **3**.

Время, мин	Концентрация		Время, мин	Концентрация		
	Соед. 1 , нг/мл	AZT, нг/мл		Соед. 3 , нг/мл	Соед. 1 , нг/мл	AZT, нг/мл
0	4460	0	0	5465	0	0
1	4081	234	1	3954	777	307
5	3640	239	10	93	1908	2602
10	3515	373	30	16	1058	3017
20	3004	661,5	60	8,5	378	3537
40	1995	1567	90	0	125	3637
90	990,5	2062	130	0	0	3427
120	0	2315				
150	0	2351				

После перорального введения большая часть молекул лекарственных веществ попадает в тонкий кишечник и путём последовательного прохождения кишечных эпителиальных клеток (энтероцитов), поступает в системное кровообращение через воротную вену. Однако некоторые высоколипофильные лекарства (как правило, $\log P > 5$, растворимость в жирах > 50 мг/г) при прохождении через энтероциты будут ассоциироваться с секретруемыми энтероцитами липопротеинами, в частности хиломикронами. Затем препарат, связанный с хиломикроном, секретируется в брыжеечную лимфатическую циркуляцию, а не в циркуляцию в воротной вене, приводящей к метаболизму в печени [65,82]. Данный подход позволяет увеличить время циркуляции лекарственного средства и увеличить его концентрацию в лимфатических протоках и лимфатических узлах, которые в случае ВИЧ-инфекции являются местом терапевтического действия препаратов.

Для нацеливания AZT на лимфатический транспорт было решено конъюгировать соединение **2** с модифицированным глицерином, имитируя тем самым триглицерид. Известно, что жирные кислоты с длинной цепью ($> C_{14}$) обычно показывают усиленную лимфатическую абсорбцию (40-60% пролекарства попадает из кишечника в лимфу) и стабильность при циркуляции по сравнению с более короткими цепями [70, 82]. Исходя из этого, было решено использовать в качестве модифицирующего фрагмента 1,3-дипальмитоилглицерин **6**. Для синтеза этого соединения к 1,3-дигидроксиацетону, растворённому в хлороформе, в атмосфере аргона прибавляли избыток (2.1 экв.) хлорангирида пальмитиновой кислоты в присутствии пиридина (схема 2). Целевое вещество **5** выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе хлороформ:метанол 99:1, контролируя выход с колонки продукта по ТСХ с прожигом. Выход составил 77%. Далее полученный кетон восстанавливали избытком (1.3 экв.) боргидрида натрия при температуре $5^{\circ}C$ в течение 30 минут. После обработки реакции путём поэтапной промывки раствором бикарбоната

натрия, водой и хлоридом натрия выход вещества **6** составил 86%. Для получения пролекарственного соединения осуществляли конъюгацию производного **2** с избытком (1.2 экв.) 1,3-дипальмитоилглицерина в хлористом метиле в присутствии конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и диметиламинопиридина (схема 2). Продукт реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой гексан:этилацетат с увеличением полярности системы от 9:1 до 2:1, выход составил 38%.

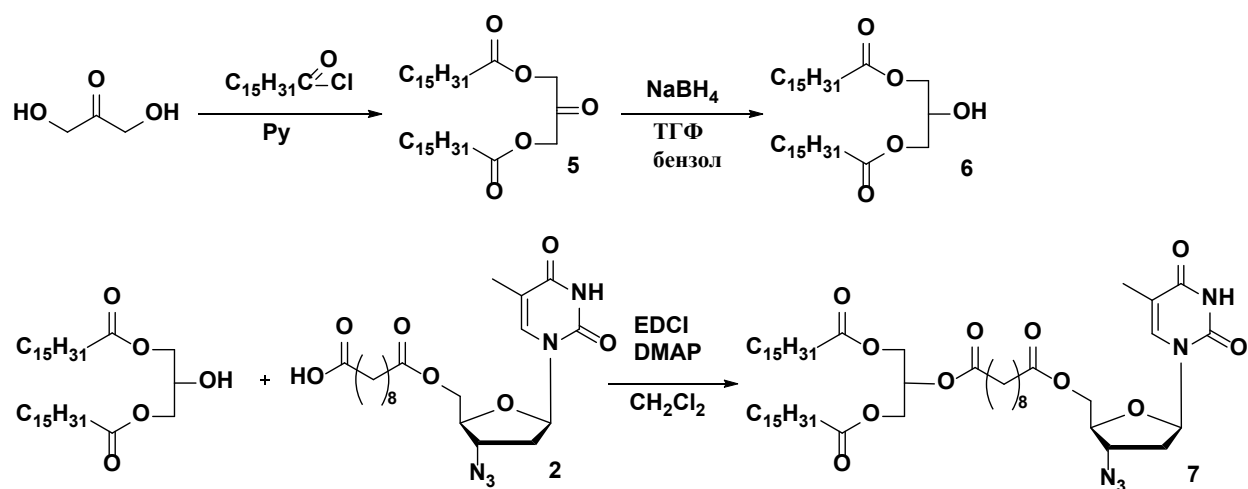


Схема 2. Схема синтеза депо-формы **7**.

Исследование гидролиза соединения **7** после перорального приема крысами, выполненное в «Ассоциации АЗТ», показало его способность попадать в лимфу, при этом концентрация АЗТ-содержащих продуктов спустя 2 часа в лимфе была выше, чем в плазме крови (таблица 2).

Таблица 2. Гидролиз соединения 7 в плазме и лимфе крысы.

Вводимое вещество	Доза в пересчете на AZT, мг/кг(ммоль/кг)	AZT в плазме, нг/кг	AZT в плазме после щел.гидролиза, нг/мл	AZT в лимфе, нг/мл	AZT в лимфе после щел.гидролиза, нг/мл
2 часа					
AZT	32 (0,12)	1877	---	1724	---
7	32 (0,12)	1256	1729	1462	2348
4 часа					
AZT	25 (0,10)	1310	---	798	---
7	25 (0,10)	1143	---	709	772

Однако исследование фармакокинетики соединения 7 на кроликах при пероральном введении в дозе 185 мг, соответствующей 50 мг AZT, в сравнении с AZT (таблица 3) показало, что соединение 7 легко гидролизуется до исходного AZT и не обладает ожидаемым пролонгированным действием.

Таблица 3. Исследование фармакокинетики соединения 7 в плазме крови кролика.

Соединение 7			AZT	
Время, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл	Концентрация AZT в плазме, после щелочного гидролиза, нг/мл	Время, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл
0 (фон)	48	48	0 (фон)	43
1	2 236	2 750	1	2 381
2	1 053	1 477	2	2 004
4	527	555	4	737
6	97	326	6	240
8	53	325	8	112
24	0	187	24	50

Таким образом, стало понятно, что структура полученного пролекарства нуждается в изменениях. Было решено изменить линкер, соединяющий AZT с глицериновым фрагментом, на более устойчивый к гидролизу карбонильный. Для синтеза соединения 8 к раствору 1,3-дипальмитоилглицерина в безводном хлористом метиле в присутствии пиридина прибавили 0.33 экв. трифосгена (схема 3). Через 2 часа в

реакционную смесь добавили 1.2 экв. азидотимидина и оставили реакцию на ночь. После очистки с помощью колоночной хроматографии при элюировании системой хлороформ:метанол 98:2 выход вещества **8** составил 32%.

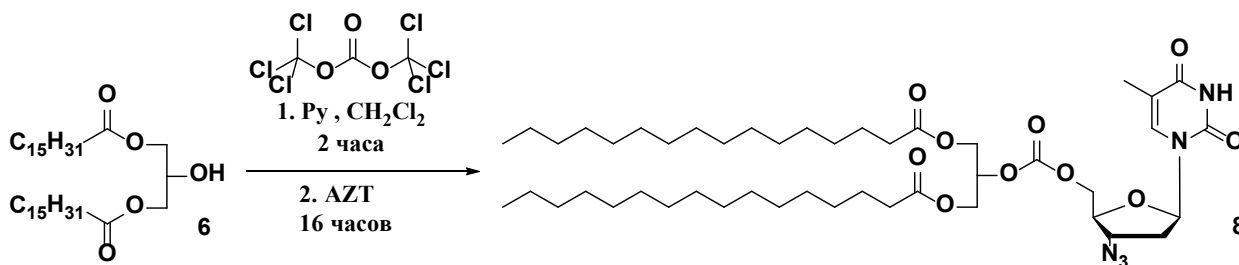


Схема 3. Синтез депо-формы **8**.

Описанным выше методом был получено 1.2 г потенциальной депо-формы **8** для оценки стабильности в крови и исследования фармакокинетических параметров. При содействии «Ассоциации AZT» были проведены первые оценочные исследования гидролиза соединения **8** после перорального приема крысами (таблица 4). Полученные данные свидетельствуют, что спустя 2 часа большее количество AZT-содержащих веществ находится в плазме, а не в лимфе. Таким образом, усиления лимфатического транспорта достичь не удалось, и требуются дальнейшие модификации структуры пролекарства.

Таблица 4. Гидролиз соединения **8** в плазме и лимфе крысы.

Время забора плазмы и лимфы, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл		Концентрация AZT в лимфе, нг/мл	
	без щелочного гидролиза	после щелочного гидролиза	без щелочного гидролиза	после щелочного гидролиза
1	5 403	7 886	5 182	7 951
2	3 194	4 066	2 035	2 803

Несмотря на то, что на данном этапе не удалось получить депо-формы AZT, позволяющей эффективно доставлять его в лимфу и обеспечивающей пролонгированное нахождение там, полученные нами соединения помогли

узнать больше о зависимости между структурой подобных веществ и их стабильностью, способностью к гидролизу в биологических жидкостях, и тем самым приблизить к созданию эффективного пролекарства.

2. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ЦМВ

С момента обнаружения СПИДа, вызываемого ВИЧ, сопутствующие инфекции стали серьезной клинической проблемой. Одной из наиболее распространенных оппортунистических инфекций является цитомегаловирус (ЦМВ) человека. Сама по себе ЦМВ-инфекция часто протекает бессимптомно, но для ВИЧ-инфицированных пациентов она представляет серьезную проблему, приводя к тяжелым заболеваниям органов и даже смерти. Поэтому возникла идея синтеза соединений, объединяющих в себе одновременно противовирусные активности в отношении ВИЧ и ЦМВ. Одним из способов конструирования препаратов с двойной активностью является создание гетеродимеров молекул, подавляющих соответствующие патогены. Такие гетеродимеры являются пролекарствами исходных препаратов, где одно лекарство служит носителем для другого и наоборот. Данный подход может обеспечивать определенные преимущества, например, медленное высвобождение активных соединений, что обычно приводит к меньшей токсичности, чем комбинация исходных препаратов. В своей работе мы объединяли ненуклеозидные ингибиторы (НИИ) репликации цитомегаловируса (ЦМВ) **9a-f** с AZT, классическим нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ ВИЧ), для получения гетеродимеров двойного действия. Фармакокинетический профиль AZT со скачками уровня в крови приводит к токсичности и появлению штаммов, устойчивых к ВИЧ-1, а производные урацила **9a-f** нерастворимы в воде, что сильно затруднило проведение их доклинических и клинических исследований. Мы предположили, что синтез объединённых пролекарств может помочь решить проблемы обоих противовирусных агентов.

Сначала коллегами из Волгоградского государственного медицинского института был осуществлён одностадийный синтез ряда [2,6-диоксо-3-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-3,6-дигидропиримидин-1-(2Н)-ил]уксусных кислот **10a-f**, получение которых заключалось в обработке исходных 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производных урацила **9a-f** этиловым эфиром бромуксусной кислоты в растворе ДМФА в присутствии K_2CO_3 с последующим щелочным гидролизом. Далее мы получали целевые конъюгаты **11a-f** конденсацией AZT и кислот **10a-f** в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в пиридине (схема 4). После выделения и очистки колоночной хроматографией на силикагеле выходы 5'-[2,6-диоксо-3-(ω-феноксиалкил)-3,6-дигидропиримидин-1(2Н)-ил]ацетатов 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина **11a-f** составили 52-74%.

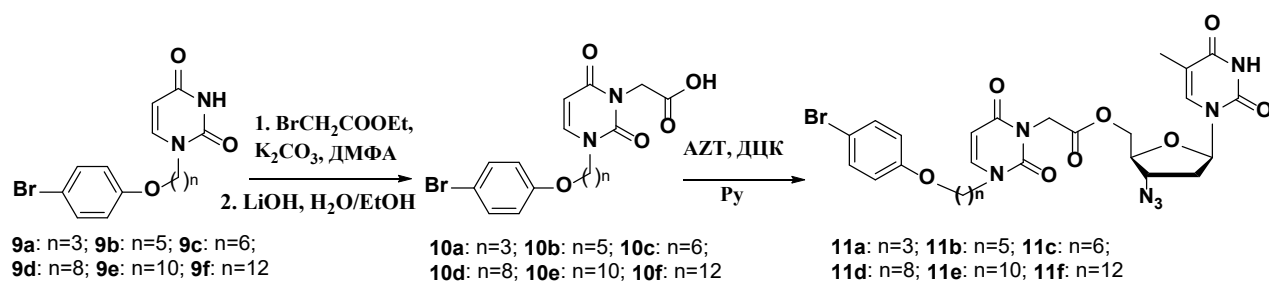


Схема 4. Синтез гетеродимеров **11a-f**.

В результате проведения биологических испытаний на культурах клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, была определена противовирусная активность соединений **11a-f** (EC_{50} 0.3-0.83 μM). Также на культуре диплоидных фибробластов лёгкого человеческого эмбриона WS1, инфицированных ЦМВ, были получены данные по противовирусной активности (EC_{50} 3-12 μM). В результате испытаний на обеих культурах клеток было установлено, что все полученные соединения нетоксичны ($CC_{50} > 100 \mu M$). При этом, как сообщалось ранее, анти-ЦМВ соединения **9a-f** и соединение **10c** (выбранное как представитель группа соединений **10a-f**) не обладали активностью против ВИЧ-1. Анти-ЦМВ активность соединений **9a-**

f находится в диапазоне 4–20 μM [83]. AZT же не обладает какой-либо анти-ЦМВ активностью [84].

Мы предположили, что соединения **11a–f** могут подвергаться ферментативному гидролизу, например, эстеразами, с образованием биологически активных компонентов. С этой целью мы исследовали гидролиз соединений эстеразой печени свиньи. Мы показали, что в реакции с эстеразой образуются два основных продукта, идентифицированных с помощью ТСХ и масс-спектрометрии высокого разрешения как AZT и соответствующие 1-[ω -(4-бромфенокси)алкил]урацилуксусные кислоты **10b–d**, а также 5-10% неидентифицированных продуктов. Следует отметить, что $T_{1/2}$ для соединений **11b** и **11c** составляет около 7-8 часов, а $T_{1/2}$ для соединения **11d** с более длинным линкером составляет 10-12 часов, хотя гидролизуемые связи одинаковы. В качестве положительного контроля использовали диацетат тимидина; его гидролиз в тех же условиях полностью завершался через 5-6 ч.

Чтобы более точно имитировать ситуацию *in vivo*, когда ВИЧ-1 и ЦМВ реплицируются у коинфицированных людей, наши коллеги в лаборатории Л. Марголиса (США) исследовали действие соединения **11c**, выбранного как представителя таких гетеродимеров, на ткани миндалин человека *ex vivo*, коинфицированной обоими вирусами. Тканевая система является подходящей моделью для доклинических испытаний лекарственных средств, поскольку не требует активации или стимуляции клеток. Она также сохраняет исходную цитоархитектуру ткани и экспрессию ключевых молекул клеточной поверхности, важных для вирусных инфекций [85]. Репликация как ВИЧ-1, так и ЦМВ в коинфицированных тканях была типичной для репликации этих вирусов в однократно инфицированных тканях человека. Соединение **11c** сохраняло свою ингибирующую активность в отношении обоих вирусов в тканях при двойном инфицировании и в концентрации 10 μM полностью подавляло репликацию ВИЧ и ЦМВ (рис.1). Для оценки цитотоксичности соединения **11c** в системе лимфоидных тканей

человека *ex vivo* фрагменты ткани миндалин были им обработаны в различных концентрациях. Жизнеспособность клеток, изолированных из экспериментальных и контрольных тканей, оценивали методом проточной цитометрии. Было показано, что конъюгат **11c** в концентрации 10 μM не проявляет цитотоксичности и не вызывает изменений в различных типах клеток ткани.

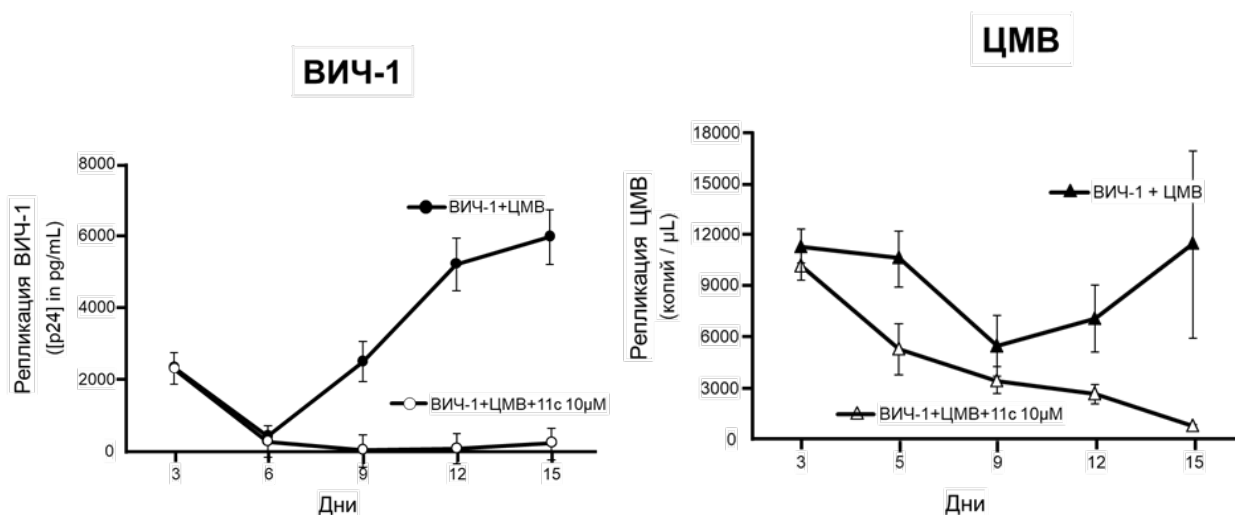


Рисунок 1. Подавление репликации ВИЧ и ЦМВ соединением **11c** в коинфицированных тканях миндалин.

Для сравнения активности, стабильности и токсичности тем же методом был синтезирован гетеродимер **12**, являющийся аналогом соединения **11c**, в котором AZT заменён на ЗТС (рис. 2). Гидролиз этого соединения под действием эстеразы печени свиньи проходил медленнее, время полугидролиза на ЗТС и кислоту **10c** составило 24 часа. Анти-ВИЧ активность **12** на культуре клеток МТ-4 составила 2 μM , при этом отсутствовала цитотоксичность – CC_{50} для **12** превышала 100 μM . В лимфоидной ткани человека, коинфицированной ВИЧ-1 и ЦМВ, гетеродимер **12** в концентрации 10 μM сохранял свою ингибирующую активность в отношении обоих вирусов.

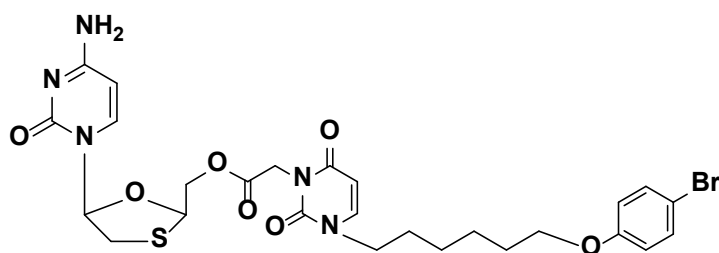


Рисунок 2. Структура соединения 12.

Полученные нами гетеродимеры являются первыми соединениями с двойным действием, подавляющими как ВИЧ-1, так и ЦМВ. Дальнейшая разработка, тестирование биологической активности таких соединений и оптимизация их фармакокинетических профилей может лечь в основу дальнейшей работы с целью создания противовирусных препаратов двойного действия против ЦМВ/ВИЧ-1.

3. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ВПГ-2/вируса Вакции/вируса Варицелла-Зостер

Вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2) является одной из наиболее распространенных в мире инфекций, и более 50% ВИЧ-инфицированных людей коинфицированы ВПГ-2 [86]. Многолетние эпидемиологические и молекулярные исследования показали сильную синергетическую связь между ВПГ-2 и ВИЧ-1 инфекциями [87,88]. В связи с вышесказанным одним из направлений данной работы стал синтез гетеродимеров, состоящих из ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (ННИОТ ВИЧ), представляющего собой остаток замещенного бензофенона, присоединенный к N-1-положению пиримидина оксиэтильным линкером [89-91], с модифицированными нуклеозидами, обладающими существенной активностью против ВПГ-2 и других вирусов семейства герпеса. При этом ННИОТ ВИЧ сами по себе являются малорастворимыми в воде соединениями, и создание депо-формы могло бы устранить этот недостаток. В качестве нуклеозидной составляющей гетеродимера, направленной на ВПГ-2, было выбрано три вещества, отличающиеся по механизму действия:

ацикловир – классический ингибитор вирусной полимеразы, 5'-нораристеромицин действующий на S-аденозилгомоцистеингидролазу, и бициклический аналог дезоксирибонуклеозида, который имеет комплексный механизм действия (рис. 3). При синтезе подобных соединений, содержащих два активных компонента, крайне важным является выбор линкера. Оптимальный линкер должен быть нетоксичным, способным последовательно соединяться с заданными функциональными группами обоих противовирусных средств и позволять молекуле гетеродимера высвобождать активные компоненты с нужной скоростью в результате химического и/или ферментативного гидролиза в организме. Иными словами, выбор линкера определяет скорость высвобождения активных компонентов и, как следствие, уровень активности отдельных соединений. Ранее фрагмент уксусной кислоты показал себя как удачный линкер для сходных гетеродимеров, поэтому было решено использовать его же.

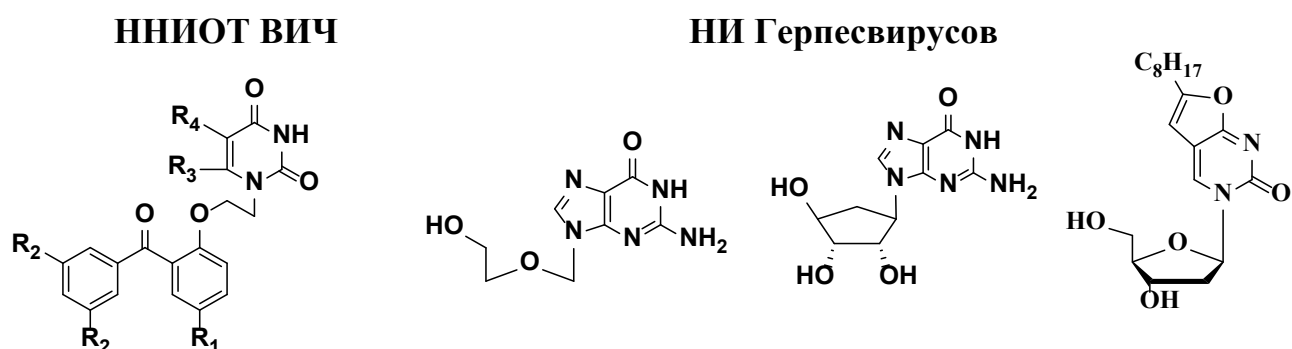


Рисунок 3. Исходные противовирусные агенты.

В первой группе соединений в качестве нуклеозидного компонента был использован ацикловир, являющийся классическим препаратом для лечения герпеса. Он представляет собой ациклический аналог гуанозина, который после внутриклеточного превращения в соответствующий трифосфат, становится терминаторным субстратом ДНК-полимеразы вируса [92]. Ацикловир является гидрофильной молекулой, и его проникновение внутрь клеток затруднено, поэтому создание депо-формы могло бы устранить этот недостаток и способствовать увеличению его эффективности. Для синтеза

соединений **14a-g** осуществляли конденсацию производных [2,6-диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусных кислот **13a-g** с ацикловиром в диметилформамиде в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI) и диметиламинопиридина (схема 5). Выход после выделения и очистки с помощью колоночной хроматографии составил 13-38%.

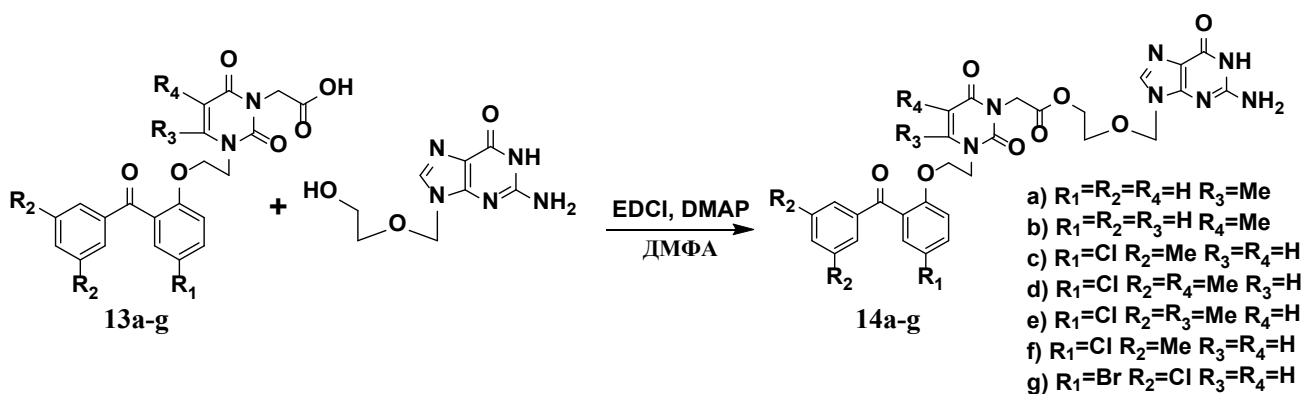


Схема 5. Синтез соединений **14a-14g**.

Вторая группа депо-форм двойного действия представляет собой конъюгаты кислот **13a-g** с 5'-нораристеромицином. 5'-Нораристеромицин – 5'-норкарбоциклический аналог аденозина, лишен метиленового фрагмента в 5'-положении и, как следствие, не может подвергаться внутриклеточному фосфорилированию, что исключает его ингибирующее действие в качестве терминатора роста цепи нуклеиновой кислоты. Однако 5'-Нораристеромицин является эффективным ингибитором клеточного фермента S-аденозилгомоцистеингидролазы и обладает широким спектром антивирусной активности, в том числе и против вирусов семейства герпеса [93]. Конденсацией кислот **13a-g** с 4-(6-амино-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)циклопент-2-ен-1-олом в условиях описанных выше и последующим окислением двойной связи карбоциклического фрагмента конъюгатов **15a-15d** в присутствии тетраоксида осмия (схема 6) получали соединения **16a-16d**. Стоит отметить, что выходы продуктов на стадии конденсации в данном случае были существенно выше (52-76%), чем в реакциях с ацикловиром (13-

38%). Общие выходы целевых конъюгатов **16a-16d** в расчете на 4-(6-амино-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)циклопент-2-ен-1-ол составили 24-38%.

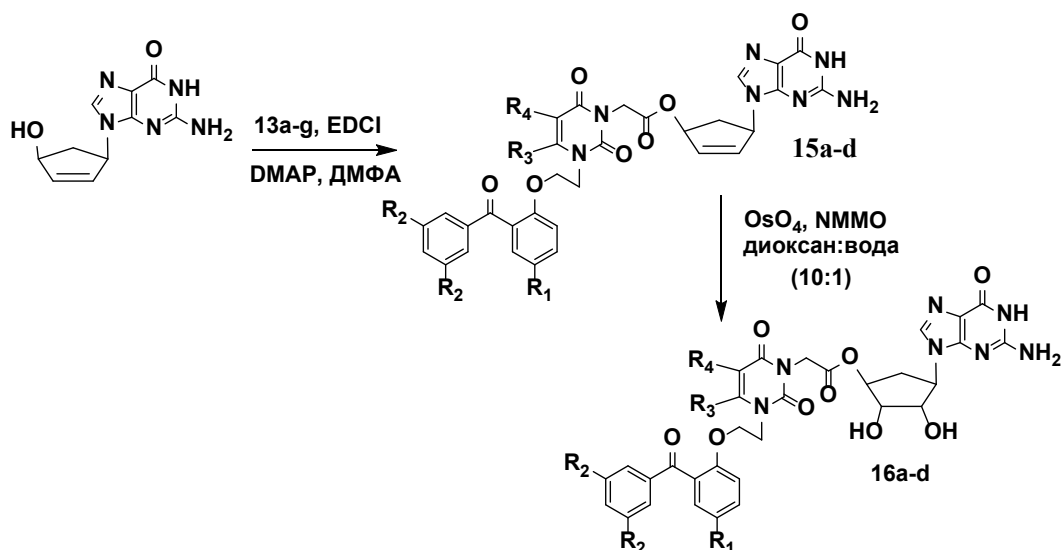


Схема 6. Синтез соединений **16a-16g**.

Мы предположили, что соединения **14a-g** и **16a-d** способны подвергаться ферментативному гидролизу с образованием биологически активных компонентов и выбрали эстеразу печени свиньи для проверки данной гипотезы. В качестве примеров взяты соединения **14d** и **16d**. $T_{1/2}$ для обоих соединений составляет около 9 ч, а полный гидролиз проходит через 30 ч. Продукты гидролиза для **14d** и **16d** были идентифицированы методом ТСХ как ацикловир или 5'-нораристеромицин, соответственно, и кислота **13d**. В обоих случаях не обнаружено даже следов исходного замещённого бензофенона. Диацетат тимидина использовали в качестве положительного контроля, его гидролиз полностью завершился через 4 ч в тех же условиях.

Соединения **14a-g** и **16a** показали отсутствие цитотоксичности на культурах клеток SEM (человеческие лимфоциты) и HEL (фибробласты легких человеческих эмбрионов). В результате исследования биологической активности гетеродимеров на культуре клеток SEM, инфицированных ВИЧ-1 (штамм Шв), было установлено, что соединения **14a**, **14c-g**, **16a-d** обладают анти-ВИЧ активностью в диапазоне 2-49 μ M, но она ниже, чем у исходных ННИОТ. Ацикловир-содержащие гетеродимеры **14a-g** были протестированы

на культуре клеток HEL, инфицированных ВПГ-2, они продемонстрировали активность от 9.4 до 43.4 μM , что в 5-25 раз меньше, чем у исходного ацикловира. Соединения **16a-d** также были исследованы на наличие активности против ВПГ-2, однако её не оказалось. Вместе с тем соединения **16b-16d** проявляли умеренную активность против цитомегаловируса, **16b** и **16d** были активны против вируса вакцинии, а **16c** и **16d** показали слабую активность против вируса Варицелла-Зостер. Отсутствие высокой противовирусной активности гетеродимеров **14a-g** и **16a-d** позволяет предположить, что гидролиз сложноэфирной связи и высвобождение аналогов нуклеозидов в условиях клеточного эксперимента происходит слишком медленно, чтобы эффективно и своевременно доставлять лекарство. Значительное падение анти-ВИЧ активности, вероятно, связано с отсутствием гидролиза остатка уксусной кислоты из урацильного фрагмента. Вместо ННИОТ были получены малоактивные уксусные кислоты **13a-g**. В дальнейшем с помощью оптимизации линкера можно будет достичь более эффективного гидролиза и получить более высокий ингибирующий эффект.

Третья группа гетеродимеров, представляет собой конъюгаты [2,6-диоксо-3-[(2-(3,5диметилбензоил)-4-хлорфенокси)этил]-4-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусных кислот **13a-g** и 3-(4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-6-октилфуоро[2,3-d]пиримидин-2(3H)-она **17**, являющегося высокоэффективным ингибитором вируса Варицелла-Зостер. Синтез бициклического аналога дезоксирибонуклеозида осуществляли по реакции Сонагаширы в присутствии катализатора палладия на угле. Дальнейшую конденсацию полученного соединения **17** с производными уксусной кислоты осуществляли в ранее описанных условиях (схема 7). Продукты выделяли препаративной хроматографией на пластинах с силикагелем. Выход гетеродимеров **18a-c** составил 24,5-29%. Полученные гетеродимеры **18a-c** обладали низкой химической стабильностью при комнатной температуре, поэтому оценка их биологической активности затруднена.

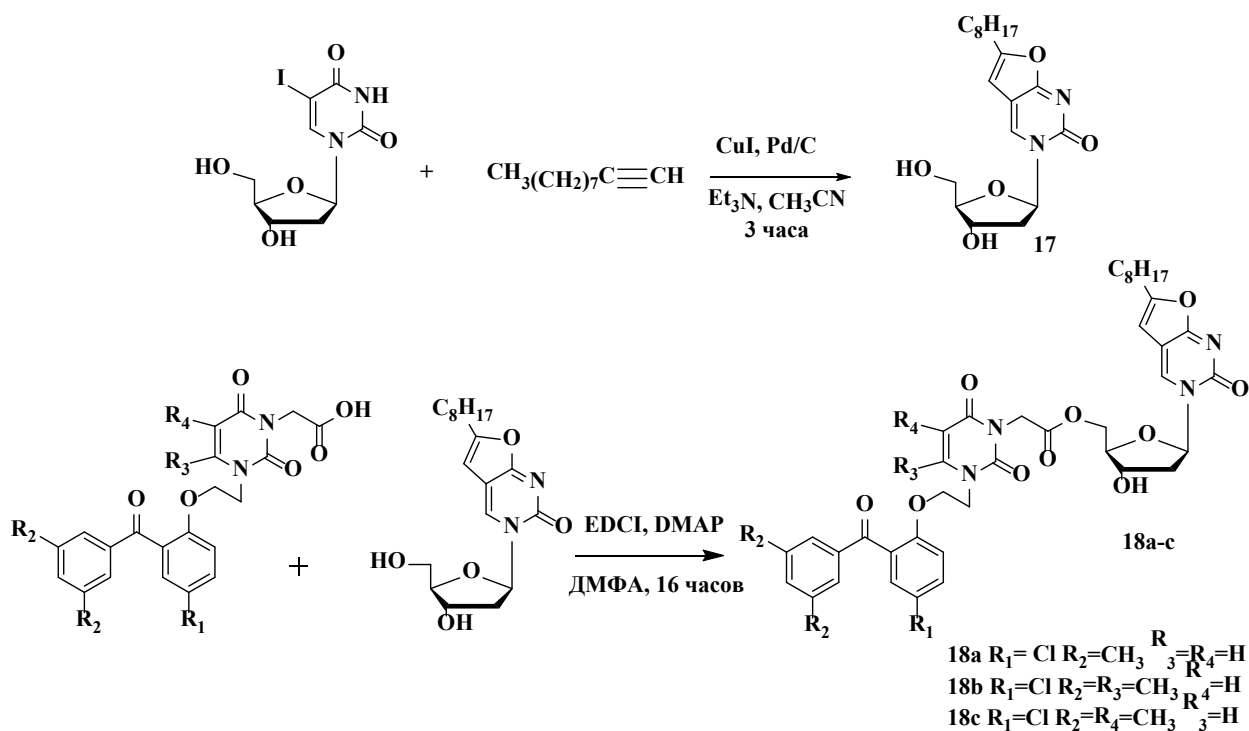


Схема 7. Синтеза гетеродимеров 18а-с.

4. 5-замещённые производные уридина как потенциальные ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавируса

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2, начавшаяся в 2020 году, уже стала причиной смерти 6,5 млн. человек. Инфицированные ВИЧ люди входят в группу повышенного риска при заболевании новой коронавирусной инфекцией. Даже при наличии вакцинации результаты лечения COVID-19 из-за ослабленной иммунной системы значительно хуже [94]; риск смертности от COVID-19 среди ВИЧ-инфицированных в два раза выше [95]. Несмотря на значительные усилия, высокоэффективных и специфичных лекарственных средств против SARS-CoV-2 создано крайне мало.

Ранее было показано, что аналоги пуриновых нуклеозидов, так называемые флексимеры - модифицированные нуклеозиды, в которых бициклическое гетероциклическое основание разделено на две отдельные части, имидазольное и пиримидиновое кольца, соединенные одной углерод-углеродной связью, способны ингибировать репликацию коронавирусов HCoV-NL63 и MERS-CoV в культуре клеток [96-97]. Эта модификация

вносит дополнительную гибкость в молекулу, которая способствует расширению структурных взаимодействий с клеточной мишенью. В попытке получить новые ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавируса и в дальнейшем осуществить их конъюгацию с соединениями, обладающими анти-ВИЧ активностью, нами была синтезирована серия 5-замещённых производных уридина, которые можно рассматривать как «обратные флексимеры».

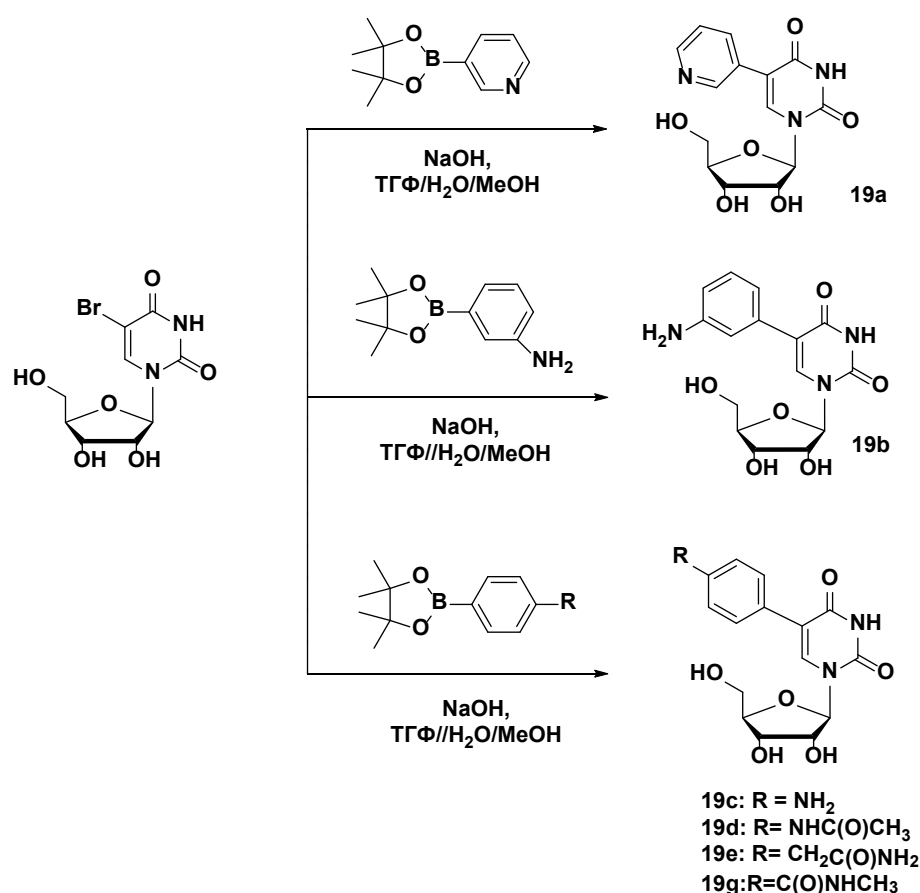


Схема 8. Синтез 5-замещённых производных уридина **19a-g**.

Синтез осуществляли по реакции кросс-сочетания Сузуки-Мияуры между 5-бромуридином и различными боронатами в системе растворителей H₂O/MeOH/ТГФ 2:1:2 в присутствии катализатора тетракси(трифенилфосфин)палладия (схема 8). Целевые продукты **19a-g** выделяли с помощью ионообменной хроматографии, выход составил 37-59%. Синтезированные вещества **19a-g** были переданы для оценки биологической активности и цитотоксичности в Федеральный научный центр исследований

и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН. Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом ПИК35 вируса SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N⁴-гидроксицитидин (EC₅₀>5мкМ). Однако соединения **19a-g** не проявили ожидаемого ингибирующего эффекта (EC₅₀>100мкМ). Очевидно, что для эффективного подавления SARS-CoV-2 требуется модификация структуры соединений, а полученные соединения исследуются на наличие активности в отношении других патогенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В реакциях использовали коммерчески доступные реагенты фирм Aldrich, Acros и Fluka. Растворители очищали в соответствии со стандартными методиками. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинах с закрепленным слоем силикагеля silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Препаративную ТСХ проводили на стеклянных пластинках 20x20 мм с закрепленным слоем силикагеля 1-2 мм silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60, 40-63 мкм (Merck, Германия). Обращенно-фазовую колоночную хроматографию проводили на носителе LiChroprep RP-18.

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J, Гц) регистрировали на спектрометре Bruker AMX III-400 с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР и 100,6 МГц для ¹³C-ЯМР. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II методом электрораспылительной ионизации (ESI). 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 - 174 азот (4 л/мин), температура интерфейса - 180°C. Образцы плазмы и лимфы анализировали на жидкостном хроматографе высокого давления фирмы «Shimadzu» (Япония), в комплект которого входили насос высокого давления (модель LC-20AD), УФ-детектор с переменной длиной волны (модель SPD-20A), автосэмплер (модель SIL-20A), колоночный термостат (модель CTO-20A) и вакуумный дегазатор (модель DGU-20A), аналитическая колонка: «Luna C18(2)» 150 x 4,6 мм с зернением 5 мкм.

1. Липофильные депо-формы 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина

1.1. Общая методика синтеза депо-форм 1-4

Смесь 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина (1 ммоль, 267 мг) и соответствующей дикарбоновой кислоты (1 ммоль) (субериновой (n=6) или себаценовой (n=8)) два раза переупарили с пиридином (5 мл), затем растворили в абсолютном пиридине (5 мл) и добавили дициклогексилкарбодиимид (1 ммоль, 206 мг). Ход реакции контролировали по ТСХ, элюировали системой хлороформ : метанол (95:5). Rf 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина в этой системе составил 0.35, а для продукта моноприсоединения **1** и **2** – 0.28 и 0.31, а для продуктов бисприсоединения **3** и **4** – 0.58 и 0.64, соответственно. Реакционную массу перемешивали 20 часов при комнатной температуре, затем добавили 200 мкл воды и отфильтровали выпавший осадок. Фильтрат упарили на водоструйном насосе, остаток растворили в хлороформе и делили колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали сначала чистым хлороформом для выделения продуктов бисприсоединения **3** или **4**, далее затем системой хлороформ:метанол сначала в соотношении 98:2, а затем 97:3 для разделения остаточного 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина и продукта моноприсоединения **1** или **2**.

3'-Азидо-2'-дезокситимидинилгександиовая кислота (**1**), выход 37%. ¹H-ЯМР спектр (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 1.28-1.40 (м, 6H, HOOCCH₂CH₂(CH₂)₃CH₂), 1.66-1.68 (м, 4H, HOOCCH₂CH₂(CH₂)₃CH₂), 1.95 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.34-2.42 (м, 2H, HOOCCH₂(CH₂)₅COO-), 2.44-2.52 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 4.08-4.23 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.23-4.25 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.35-4.44, (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 6.03-6.11 (т, 1H, 1'CH, Azt), 7.26 (с, 1H, H-6, Thy), 9.5 (с, 1H, NH). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 12.1, 24.6, 24.7, 28.8, 29.4, 33.9, 34.0, 37.2, 60.5, 63.1, 81.6, 85.2, 111.0, 135.5, 150.3, 164.4, 173.4, 176.6. HRMS: найдено m/z 424.1824, рассчитано для C₁₈H₂₅N₅O₇ [M+H]⁺ 424.1827.

3'-Азидо-2'-дезокситимидинилоктандиовая кислота (**2**), выход 32%. ¹H-ЯМР спектр (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 1.27-1.33 (м, 10H, HOOCCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂), 1.63-1.67 (м, 4H, HOOCCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂), 1.95 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.35-2.40 (м, 2H, HOOCCH₂(CH₂)₇COO-), 2.42-2.49 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 4.08-4.22 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.25-4.26 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.35-4.43 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 6.08-6.12 (т, 1H, 1'CH, Azt), 7.25 (с, 1H, H-6, Thy), 9.38 (с, 1H, NH). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 12.1, 24.6, 24.7, 28.8x3, 29.4, 33.9, 34.0, 37.2, 60.5, 63.1, 81.6, 85.2, 111.0, 135.5, 150.3, 164.4, 173.4, 176.6. HRMS: найдено m/z 452.2132, рассчитано для C₂₀H₂₉N₅O₇ [M+H]⁺ 452.2140.

1,8-(3'-Азидо-2'-дезокситимидин)-гександиоат (**3**), выход 60%. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 1.35-1.38 (м, 4H, -OOCCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂COO-), 1.66 (м, 4H, -OOCCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂COO-), 1.95 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.35-2.40 (м, 4H, -OOCCH₂(CH₂)₄CH₂COO-), 2.45-2.52 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 4.09-4.12 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.25-4.28 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.37-4.38 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 6.03-6.08 (т, 1H, 1'CH, Azt), 7.23 (с, 1H, H-6, Thy), 9.3 (с, 1H, NH). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 12.6, 25.3, 29.0, 33.7, 37.6, 60.7, 63.2, 81.9, 85.6, 111.7, 135.3, 149.9, 163.5, 173.1. HRMS: найдено m/z 673.2687, рассчитано для C₂₈H₃₆N₁₀O₁₀ [M+H]⁺ 673.2689.

1,8-(3'-Азидо-2'-дезокситимидин)-октандиоат (**4**), выход 57%. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 1.18-1.27 (м, 8H, -OOCCH₂CH₂(CH₂)₄CH₂CH₂COO-), 1.66-1.76 (м, 4H, -OOCCH₂CH₂(CH₂)₄CH₂CH₂COO-), 1.90 (с, 6H, CH₃x2, Thy), 2.30-2.46 (м, 8H, -OOCCH₂(CH₂)₄CH₂COO- и 2'CH₂x2, Azt), 4.09-4.12 (м, 2H, 4'CHx2, Azt), 4.25-4.28 (м, 2H, 3'CHx2, Azt), 4.37-4.38 (м, 4H, 5'CH₂ x2, Azt), 6.03-6.08 (т, 2H, 1'CHx2, Azt), 7.23 (с, 2H, H-6x2, Thy), 9.3 (с, 2H, NH x2, Azt). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 12.4, 25.0, 29.0, 29.3, 33.7, 37.9, 60.7, 63.3, 82.0, 86.5, 111.2, 135.3, 149.9, 163.5, 173.1. HRMS: найдено m/z 701.3001, рассчитано для C₃₀H₄₀N₁₀O₁₀ [M+H]⁺ 701.3002.

1.2. Исследование стабильности соединений 1 и 3 в плазме крови кролика

Аликвоты растворов соединений в ДМСО с концентрациями 360 и 440 мкг/мл для **1** и **3** соответственно объемом 25 мкл вносили во флакон с 2 мл плазмой крови кролика, и инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 0,25 мл. К 0,25 мл отобранной после инкубации плазмы добавляли 0,75 мл ацетона и выдерживали в ультразвуковой бане в течение 5 минут. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут супернатант переносили в чистую пробирку и упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл воды и 100 мкл вводили в хроматограф.

Условия хроматографии для соединения 1

Подвижная фаза: 30% ацетонитрил в 1% растворе ортофосфорной кислоты + 2% триэтиламина. Скорость потока – 1,5 мл/мин, температура колонки 38°C, длина волны поглощения – 265 нм. Шкала детектора 1 mAU FS. Время удержания **1** составило 7,2 - 7,7 минуты.

Условия хроматографии для соединения 3

Подвижная фаза: 30% ацетонитрил в 1% растворе ортофосфорной кислоты + 2% триэтиламина. Скорость потока – 1,5 мл/мин, температура колонки 38°C, длина волны поглощения – 265 нм. Шкала детектора 1 mAU FS. Время удержания **3** составило 7 - 7,5 минут.

1.3. Синтез 1,3-пальмитоилпропан-2-она (5)

1,3-дигидроксиацетон (5 ммоль, 450 мг) растворили в хлороформе. К полученному раствору в атмосфере аргона при комнатной температуре при перемешивании добавили 3,5 мл хлорангидрида пальмитиновой кислоты и 2 мл безводного пиридина. Гомогенную смесь перемешивали 3 часа. Далее реакционную массу упарили и делили колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали сначала чистым хлороформом, затем системой хлороформ:метанол 99:1, контролируя выход с колонки продукта по ТСХ с

прожигом. Целевой продукт **5** был выделен с выходом 76% и охарактеризован методами ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.88-0.93 (т, *J* = 20 Гц, 6H, 2CH₃), 1.28-1.39 (м, 48H, 2xCH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂), 1.64-1.71 (м, 4H, 2xβCH₂), 2.42-2.47 (м, 4H, 2xαCH₂), 4.77 (с, 4H, OCH₂CH(O)CH₂O).

1.4. Синтез 1,3-пальмитоилглицерина (6)

К раствору полученного соединения **5** (0,565 ммоль, 320 мг) в смеси тетрагидрофурана (4мл) и бензола (1мл) медленно добавили воду (0,5 мл) при непрерывном перемешивании. Полученную смесь охлаждали при температуре -17°C в течении 20 минут. Далее к полученной молочно-белой суспензии добавили боргидрид натрия (0,75 ммоль, 28 мг), через 30 минут его избыток нейтрализовали несколькими каплями ледяной уксусной кислоты. Затем к реакционной массе добавили 50 мл и промывали водой, потом водным раствором бикарбоната натрия и снова водой. Органическую фазу сушили сульфатом натрия и упарили. Был получен продукт с выходом 86%. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.88-0.93 (т, *J* = 20 Гц, 6H, 2CH₃), 1.28-1.36 (м, 48H, 2xCH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂), 1.61-1.70 (м, 4H, 2xβCH₂), 2.34-2.39 (м, 4H, 2xαCH₂), 4.13-4.21 (м, 4H, OCH₂CH(OH)CH₂O). HRMS: m/z[M + Na]⁺ рассчитано для C₃₅H₆₈O₅: 591.4959, найдено: 591.4946.

1.5. Синтез 2-(2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин-5'-оксидеканоил)-1,3-дипальмитоилглицерина (7)

Полученный спирт **6** (0,2148 ммоль, 102 мг) дважды переупарили с толуолом. Соединение **2** (0,215 ммоль, 100 мг) растворили в дихлорметане, добавили спирт **6**, 4-диметиламинопиридин (0,0895 ммоль, 11 мг), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (0,217 ммоль, 42 мг) в атмосфере аргона. Реакционную массу перемешивали 24 часа, далее упарили, растворили в дихлорметане и делили колоночной хроматографией на силикагеле. Элюировали смесью гексан:этилацетат в соотношении 9:1, 3:1, 2:1. Целевой продукт **7** был выделен с выходом 20%. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.85-

0.89 (м, 6H, 2CH₃, Palm), 1.24-1.29 (м, 56H, CH₂CH₂(CH₂)₄CH₂CH₂ + 2 CH₃(CH₂)₁₂CH₂CH₂, Palm), 1.56-1.67 (м, 4H, 2xβCH₂, Palm), 2.03 (с, 1H, CH₃, Thy), 2.28-2.35 (м, 4H, 2xαCH₂), 2.37-2.47 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 4.07-4.17 (м, 5H, 4'CH, Azt + OCH₂CH(O)CH₂O), 4.26-4.39 (м, 3H, 3'CH, Azt + 5'CH₂, Azt), 5.23-5.25 (м, 1H, OCH₂CH(O)CH₂O), 6.08 (т, 1H, 1'CH, Azt), 7.32 (с, 1H, 6CH, Thy), 8.29 (с, 1H, NH). ¹³C-ЯМР(CDCl₃): 12.47, 14.09x2, 22.68x2, 24.81x2, 24.90x2, 29.11x2, 29.26x3, 29.35x3, 29.46x2, 29.60x6, 29.65x4, 29.69x4, 31.92x2, 33.95x3, 34.11, 37.65, 59.79, 61.65, 61.72x2, 65.04, 66.06, 74.28, 81.59, 85.23, 111.32, 135.42, 149.97, 153.99, 163.28, 173.27x2. HRMS: m/z[M + Na]⁺ рассчитано для C₅₅H₉₅N₅O₁₁: 1024.6920, найдено 1024.6919.

1.6. Синтез 2-(2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин-5'-карбонил)-1,3-дипальмитоилглицерина (8)

1,3-пальмитоилглицерин (0.35 ммоль) дважды переупарили в абсолютном пиридине, последний раз не досуха, затем растворили в безводном хлористом метиле и добавили 0.33 экв. трифосгена (0.117 ммоль). Реакцию оставили перемешиваться при комнатной температуре на 2 часа, постепенно реакционная масса краснела. Затем 1.2 экв. 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина (0.42 ммоль) переупарили в абсолютном пиридине, растворили в хлористом метиле, добавили в реакцию, и оставили её на ночь при комнатной температуре. Реакционная масса стала жёлтой. Целевое вещество выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью гексан:этилацета 3:1, а затем 3:2. Выход составил 32%. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.88-0.92 (м, 6H, 2xCH₃, 2xCH₃(CH₂)₁₄C(O)), 1.27-1.35 (м, 48H, 24xCH₂, Palm), 1.57-1.67 (м, 4H, 2xβCH₂, Palm), 1.97 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.33-2.38 (м, 4H, 2xαCH₂, Palm), 2.40-2.54 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 4.06-4.10 (м, 1H, 4'Н, Azt), 4.16-4.25 (м, 2H, CH₂, 5'CH₂), 4.29-4.48 (м, 5H, 3'CH, Azt + OCH₂CH(O)CH₂O), 5.11-5.15 (м, 1H, OCH₂CH(O)CH₂O), 6.18-6.20 (т, 1H, 1'CH, J = 8 Гц, Azt), 7.37 (с, 1H, H-6, Thy), 8.84 (с, 1H, NH, Azt). ¹³C-ЯМР(CDCl₃): 12.61, 14.09x2, 22.67, 24.78, 24.86, 28.95, 29.04, 29.11, 29.26, 29.35,

29.49x2, 29.61x4, 29.65x6, 29.68x4, 31.91x2, 34.05, 34.11, 37.62, 60.72, 62.05, 63.19, 68.95, 81.85, 85.56, 111.25, 135.19, 149.93, 163.36, 172.78, 173.03, 173.29.

2. Гетеродимеры, объединяющие активность против ВИЧ и ЦМВ

Синтез 1-[ω -(4-бромфенокси)алкил]-производных урацила **9a-f** [85] и [2,6-диоксо-3-[ω -(4-бромфенокси)алкил]-3,6-дигидропиримидин-1-(2H)-ил]уксусных кислот **10a-f** был выполнен в ВолГМУ под руководством профессора М.С.Новикова.

2.1. Общая методика синтеза (3'-азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)алкил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6H)-ил)ацетатов **11a-f**

Соответствующую кислоту **10a-f** ($n = 3, 5, 6, 8, 10, 12$) (0,4 ммоль) дважды переупарили с пиридином (5 мл), затем растворили в пиридине (5 мл). К полученному раствору добавили 1,3-дициклогексилкарбодиимид (0,48 ммоль, 99 мг) и 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин (0,4 ммоль, 107 мг), оставили на 24 ч при перемешивании. Далее реакционную массу упарили и делили на хроматографической пластине 2 мм в системе хлороформ:метанол 96:4. Затем дочищали на пластине или маленькой колонке в системе этилацетат:хлороформ 3:2 с добавлением 1% метанола. Выход составил 57-74%. Продукты были охарактеризованы методами ЯМР и масс-спектрологии.

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)пропил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6H)-ил)ацетат (**11a**). Светло-жёлтое масло, выход 61%, ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 1.92 (с, 3H, CH_3 , Thy), 2.16-2.19 (м, 2H, CH_2), 2.39-2.45 (м, 2H, 2' CH_2 , Azt), 3.95-3.98 (м, 4H, CH_2N , CH_2O), 4.01-4.03 (м, 1H, 4' CH , Azt), 4.24-4.26 (м, 1H, 3' CH , Azt), 4.39-4.52 (м, 2H, 5' CH_2 , Azt), 4.59-4.84 (м, 2H, CH_2CO), 5.73-5.75 (д, H, H-5, $J=7.9$ Гц, Ura), 6.08-6.11 (т, 1H, 1' CH , Azt), 6.73-6.76 (м, 2H, H-3', H-5', Ph), 7.17-7.19 (д, 1H, H-6, $J=8$ Гц

,Ura),7.24 (с, 1H, H-6, Thy), 7.36-7.38 (м, 2H, H-2', H-6', Ph), 8.48 (с, 1H, NH)
¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃), δ, ppm : 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, 116.27×2, 132.56×2, 135.56,
143.57, 150.04, 151.25, 157.47, 162.36, 163.43, 167.65. HRMS: m/z[M + H]⁺
рассчитано для C₂₅H₂₆BrN₇O₈: 632.1099, найдено: 632.1093

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)пентил)-2,6-диоксо-2,3-
дигидропиримидин-1(6H)-ил)ацетат (**11b**). Светло-жёлтое масло, выход 74%,
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.48-1.52 (м, 2H, CH₂), 1.78-1.80 (м, 4H, 2CH₂),
1.92 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.35-2.44 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 3.74 -3.78 (т, 2H, J= 8 Гц,
CH₂N), 3.89-3.92 (м, 2H, CH₂O), 4.01-4.02 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.23-4.25 (м, 1H,
3'CH, Azt), 4.25-4.41 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 4.41-4.48 (м, 2H, CH₂CO), 5.76-5.78
(д, H, H-5, J=6 Гц, Ura), 6.08-6.12 (т, 1H, 1'CH, Azt), 6.73-6.75 (м, 2H, H-3', H-
5', Ph), 7.16-7.18 (д, 1H, H-6, J=6 Гц, Ura), 7.25 (с, 1H, H-6, Thy), 7.32-7.35 (м,
2H, H-2', H-6', Ph), 8.86 (с, 1H, NH) ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃), δ, ppm :
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, 116.32×2, 132.30×2, 135.49, 143.05, 150.11, 151.17,
158.05, 162.34, 163.59, 167.62. HRMS: m/z[M + H]⁺ рассчитано для
C₂₇H₃₀BrN₇O₈: 660.1413, найдено: 660.1412

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)гексил)-2,6-диоксо-2,3-
дигидропиримидин-1(6H)-ил)ацетат (**11c**). Светло-жёлтое масло, выход 60%,
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.37-1.41 (м, 2H, CH₂), 1.48-1.52 (м, 2H, CH₂),
1.70-1.78 (м, 4H, 2CH₂), 1.93 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.35-2.44 (м, 2H, 2'CH₂, Azt),
3.73 -3.76 (т, J=8 Гц, 2H, CH₂N), 3.89-3.93 (м, 2H, CH₂O), 4.00-4.04 (м, 1H,
4'CH, Azt), 4.22-4.26 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.38 – 4.52 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 4.61-
4.85 (м, 2H, CH₂CO), 5.75-5.77 (д, H, J=6 Гц, H-5, Ura), 6.08-6.12 (т, J=8 Гц,
1H, 1'CH, Azt), 6.73-6.76 (м, 2H, H-3', H-5', Ph), 7.15-7.17 (д, 1H, H-6, J=6 Гц,
Ura), 7.26 (с, 1H, H-6, Thy), 7.32-7.35 (м, 2H, H-2', H-6', Ph), 8.40 (с, 1H, NH)
¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃), δ, ppm : 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: $m/z[M + H]^+$ рассчитано для $C_{28}H_{32}BrN_7O_8$: 674.1568, найдено:
674.1563

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)оксил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6Н)-ил)ацетат (**11d**). Светло-жёлтое масло, выход 66%,
 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 1.34-1.43 (м, 8H, 4CH₂), 1.67-1.76 (м, 4H, 2CH₂), 1.93 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.33-2.44 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 3.73 (т, 2H, J = 7.4 Гц, NCH₂), 3.88-3.91 (м, 2H, OCH₂), 4.01-4.02 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.24-4.25 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.38-4.42 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 4.49-4.85 (м, 2H, CH₂CO), 5.76-5.78 (д, H, H-5, J=6 Гц, Ura), 6.10-6.12 (т, 1H, 1'CH, Azt), 6.73-6.77 (м, 2H, H-3', H-5', Ph), 7.16-7.17 (д, 1H, H-6, J=6 Гц, Ura), 7.27 (с, 1H, H-6, Thy), 7.32-7.36 (м, 2H, H-2', H-6', Ph), 8.56 (с, 1H, NH). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$), δ , ppm : 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: $m/z[M + H]^+$ рассчитано для $C_{30}H_{36}BrN_7O_8$: 702.1881, найдено: 702.1872

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)децил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6Н)-ил)ацетат (**11e**). Светло-жёлтое масло, выход 57%,
 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 1.25-1.41 (м, 12H, 6CH₂), 1.67-1.75 (м, 4H, 2CH₂), 1.92 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.35-2.44 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 3.72 -3.74 (м, 2H, NCH₂), 3.87-3.90 (м, 2H, OCH₂), 4.02 (м, 1H, 4'CH, Azt), 4.22-4.24 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.38-4.52 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 4.61-4.84 (м, 2H, CH₂CO), 5.76-5.78 (д, H, H-5, J=6 Гц, Ura), 6.12 (т, 1H, 1'CH, Azt), 6.73-6.75 (м, 2H, H-3', H-5', Ph), 7.16-7.18 (д, 1H, H-6, J=6 Гц, Ura), 7.27 (с, 1H, 6CH, Thy), 7.32-7.34 (м, 2H, H-2', H-6', Ph), 9.05 (с, 1H, NH). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$), δ , ppm : 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: $m/z[M + H]^+$ рассчитано для $C_{32}H_{40}BrN_7O_8$: 730.2194, найдено: 730.2190

(3'-Азидо-3'-дезокситимидин)-2-(3-((4-бромфенокси)додецил)-2,6-диоксо-2,3-дигидропиримидин-1(6H)-ил)ацетат (**11f**). Светло-жёлтое масло, выход 58%, ¹H-ЯМР спектр (400 МГц, CDCl₃): 1.24-1.41 (м, 16H, 8CH₂), 1.72-1.75 (м, 4H, 2CH₂) 1.92 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.34-2.43 (м, 2H, 2'CH₂, Azt), 3.71 (т, J = 7.5 Гц, 2H, NCH₂), 3.89 (т, J=6 Гц, 2H, OCH₂), 4.01-4.02 (т, 1H, 4'CH, Azt), 4.23-4.25 (м, 1H, 3'CH, Azt), 4.37-4.53 (м, 2H, 5'CH₂, Azt), 4.61-4.84 (м, 2H, CH₂CO), 5.76 (д, 1H, H-5, J=6Гц, Ura), 6.12 (т, J=6 Гц, 1H, 1'CH, Azt), 6.73-6.76 (м, 2H, H-3', H-5', Ph), 7.16 (д, 1H, H-6, J=6 Гц, Ura), 7.26 (с, 1H, 6CH, Thy), 7.31-7.35 (м, 2H, H-2', H-6', Ph), 8.97 (с, 1H, NH). ¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃), δ, ppm : 12.60, 26.04, 26.49, 29.07, 29.22×2, 29.39, 29.47, 29.54×3, 37.51, 42.01, 50.01, 60.23, 63.67, 68.35, 81.86, 85.13, 101.30, 111.52, 112.63, 116.42×2, 132.26×2, 135.44, 143.17, 150.22, 151.19, 158.34, 162.44, 163.68, 167.68. HRMS: m/z[M + H]⁺ рассчитано для C₃₄H₄₄BrN₇O₈: 758.2507, найдено: 758.2507

((2R,5S)-5-(4-амино-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-1,3-оксатиолан -2-ил)метил-2-(3-(6-(4-бромфенокси)гексил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)ацетат (**12**). Светло-жёлтое масло, выход 30%. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.36-1.43 (м, 2H, CH₂), 1.47-1.55 (м, 2H, CH₂), 1.72-1.79 (м, 4H, 2CH₂), 3.01-3.07 (м, 1H, 2'CH₂, 3TC), 3.49-3.55 (м, 1H, 2'CH₂, 3TC), 3.73-3.78 (т, J=8 Гц, 2H, NCH₂), 3.89-3.93 (т, 2H, OCH₂), 4.44-4.56 (м, 2H, 5'CH₂, 3TC), 4.69-4.82 (м, 2H, CH₂CO), 5.33-5.36 (м, 1H, 4'CH₂, 3TC), 5.76-5.79 (д, H, J = 6 Гц, H-5, 3TC), 5.93-5.96 (д, 1H, J = 6 Гц, H-5,Ura), 6.30-6.34 (т, 1H, J = 8 Гц, 1'CH, 3TC), 6.73-6.79 (м, 2H, H-3',H-5', Ph), 7.20-7.22 (д, 1H, H-6, J = 8 Гц, Ura), 7.33-7.38 (м, 2H, 2CH₂, H-2', H-6', Ph), 7.63-7.65 (д, 1H, H-6, J = 8 Гц, 3TC). HRMS: m/z[M + H]⁺ C₂₆H₃₀BrN₅O₇S: рассчитано для 636.1122, найдено: 636.1127

2.2. Гидролиз соединений **11c** и **12** эстеразой печени свиньи

Гидролиз соединений проводился в 30 μl 50 мМ Tris-HCl буфере с pH 8.2, содержащем 250 мМ NaCl, 6 мМ CaCl₂, 5.2 единицы/тест эстеразы и различные концентрации соединений **11c** и **12** (2-10 мМ) в метаноле.

Реакция протекала при 37 °С в течение 0-18 h. Продукты реакции были разделены с помощью ТСХ в системе хлороформ-этанол 32:1. R_f продуктов гидролиза **11c** - 0.69, **10c** - 0.03, **9c** - 0.44, **12** - 0.50, ЗТС - 0.30, AZT - 0.51. Соединения **9c**, **10c**, AZT и ЗТС были использованы как свидетели. Продукты были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии.

3. Гетеродимеры, объединяющие активность против ВИЧ и вирусов из семейства герпеса и вируса Вакцинии

Синтез [2,6-диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусных кислот **13a-g** был выполнен в ВолгМУ под руководством профессора М.С.Новикова.

3.1. Общая методика синтеза производных ацикловира **14a-g**

Смесь соответствующей [2,6-диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусной кислоты (0.5 ммоль) **13a-g** и ацикловира (0.5 ммоль) дважды переупарили в ДМФА, затем растворили в 5 мл ДМФА и добавили 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1.2 экв) и диметиламинопиридин (0.5 экв). Реакционная смесь перемешивалась в течении 16 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. растворитель упарили, и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя системой хлороформ:метанол 9:1. Выход целевых продуктов составил 22-38%.

[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-6-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14a**), выход 33%. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD:CDCl₃): 1.97 (3H, с, CH₃), 3.88-3.91 (2H, м, CH₂O), 4.04-4.07 (2H, м, CH₂N), 4.24-4.37 (4H, м, 2xCH₂CH₂C=O), 4.58 (2H, с, NCH₂C=O), 5.29 (1H, д, H-5 Ura), 5.64 (2H, с, OCH₂N), 7.06-7.12 (2H, м, Ph), 7.24-7.28 (1H, д, Ph), 7.40-7.52 (3H, м, Ph), 7.54-7.60 (1H, м, Ph), 7.73-7.76 (2H, д, Ph), 9.02 (1H, с, H-8). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆): 19.9, 41.9, 44.6, 64.3, 66.1, 66.7, 72.3, 100.6, 113.25, 117.0, 121.7, 129.0, 129.1, 129.2, 129.7, 132.3, 134.1, 136.9, 138.0, 151.6,

151.9, 153.9, 154.6, 155.6, 155.6, 157.2, 161.0, 168.3, 196. HRMS: $m/z[M + H]^+$ рассчитано для $C_{30}H_{29}N_7O_8$: 616.2150, найдено: 616.2136.

[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14b**), выход 23%. 1H ЯМР (400 МГц, $CD_3OD:CDCl_3$): 1.72 (3H, с, CH_3), 3.70-3.78 (2H, м, CH_2O), 3.91-3.94 (2H, м, CH_2N), 4.20-4.30 (4H, м, $2 \times CH_2CH_2C=O$), 4.61 (2H, с, $NCH_2C=O$), 5.49 (2H, с, OCH_2N), 6.80-6.81 (1H, с, H-6 Ura), 7.03-7.10 (2H, м, Ph), 7.30-7.33 (1H, д, $J=12$ Гц, Ph), 7.44-7.50 (3H, м, Ph), 7.57-7.60 (1H, м, Ph), 7.76-7.79 (2H, д, Ph), 8.17 (1H, с, H-8). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD): 12.0, 41.9, 64.0, 66.0, 67.2, 70.0, 72.96, 108.7, 112.5, 121.2, 128.4, 129.5, 129.8, 132.30, 137.4, 141.1, 151.0, 154.7, 155.8, 163.6, 168.1, 196.7. HRMS: $m/z[M + H]^+$ рассчитано для $C_{30}H_{29}N_7O_8$: 616.2150, найдено: 616.2128.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил)-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14c**), выход 29%. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): 2.29 (6H, с, $2 \times CH_3$), 3.77-3.78 (2H, м, CH_2O), 3.90-3.91 (2H, м, CH_2N), 4.16-4.22 (4H, м, $2 \times CH_2CH_2C=O$), 4.50 (2H, с, $NCH_2C=O$), 5.26-5.28 (1H, д, $J=8$ Hz, H-5 Ura), 5.47 (2H, с, OCH_2N), 6.79-6.82 (1H, д, $J=12$ Гц, H-6 Ura), 7.07-7.10 (1H, д, $J=12$ Гц, Ph), 7.21-7.24 (2H, м, Ph), 7.30 (2H, м, Ph), 7.45-7.42 (1H, м, Ph), 8.23 (1H, с, H-8). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD): 19.9, 31.6, 41.4, 60.9, 63.9, 66.2, 67.3, 70.2, 72.3, 72.9, 99.5, 114.3, 126.2, 127.2, 128.3, 130.8, 131.8, 135.3, 136.5, 144.7, 151.0, 154.3, 154.9, 156.7, 162.9, 168.0, 195.1. HRMS: $m/z[M - H]^+$ рассчитано для $C_{31}H_{30}ClN_7O_8$: 662.1761, найдено: 662.1763.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил)-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат (**14d**), выход 38%. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$): 1.57 (3H, с, CH_3), 2.23 (6H, с, $2 \times CH_3$), 3.61 (2H, м, CH_2O), 3.82 (2H, м, CH_2N), 4.10-4.16 (4H, м, $2 \times CH_2CH_2C=O$), 4.39 (2H, с, $NCH_2C=O$), 5.36 (2H, с, OCH_2N), 6.48 (2H, с, NH_2), 6.94 (1H, д, H-6 Ura), 7.20-7.28 (5H, м, Ph), 7.49-7.53 (1H, м, Ph), 8.27 (1H, с, H-8), 10.62 (1H, с, NH). ^{13}C ЯМР (100 МГц,

DMSO-d₆): 19.9, 21.1, 41.8, 44.6, 64.3, 66.6, 66.8, 70.3, 72.3, 100.5, 115.3, 116.8, 125.6, 127.5, 128.2, 131.2, 135.9, 136.5, 138.1, 138.6, 151.6, 151.9, 153.9, 154.4, 157.2, 160.9, 168.2, 194.5. HRMS: m/z[M + H]⁺ рассчитано для C₃₂H₃₂ClN₇O₈: 678.2074, найдено: 678.2073

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-6-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14e**), выход 24%. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 1.83 (3H, с, CH₃), 2.21 (6H, с, 2xCH₃), 3.66-3.67 (2H, м, CH₂O), 3.88-3.91 (2H, м, CH₂N), 4.12-4.17 (4H, м, 2xCH₂CH₂C=O), 4.40 (2H, м, NCH₂C=O), 5.22 (1H, д, H-5 Ura), 5.36 (2H, с, OCH₂N), 6.75 (2H, с, NH₂), 7.19-7.22 (5H, м, Ph), 7.48-7.52 (1H, м, Ph), 8.17 (1H, с, H-8), 10.94 (1H, с, NH). ¹³C NMR (100 МГц, DMSO-d₆): 12.7, 21.2, 42.0, 48.3, 64.3, 66.6, 66.8, 70.3, 72.4, 107.5, 115.6, 125.6, 127.4, 128.5, 131.1, 131.7, 135.7, 136.7, 138.4, 141.3, 150.8, 154.5, 162.7, 168.2, 194.2. HRMS: m/z[M + H]⁺ calcd for C₃₂H₃₂ClN₇O₈: 678.2074, found: 678.2076.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-бромфенокси]этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14f**), выход 22%. ¹H NMR (400 МГц, CD₃OD): 2.34 (6H, с, 2xCH₃), 3.76-3.79 (2H, м, CH₂O), 3.95-3.97 (2H, м, CH₂N), 4.23-4.26 (4H, м, 2xCH₂CH₂C=O), 4.55 (2H, с, NCH₂C=O), 5.30-5.33 (1H, д, J=12 Гц, H-5 Ura), 5.45 (2H, с, OCH₂N), 6.85-6.88 (1H, д, J=12 Гц, H-6), 7.07-7.10 (1H, д, J=12 Гц, Ph), 7.36 (1H, м, Ph), 7.39-7.40 (3H, м, Ph), 7.61-7.65 (1H, м, Ph), 7.82 (1H, с, H-8). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆): 21.1, 41.8, 48.6, 64.4, 66.5, 66.8, 70.3, 72.3, 99.8, 113.2, 115.9, 117.0, 127.4, 131.3, 131.4, 134.7, 135.7, 136.9, 138.1, 138.5, 144.9, 151.0, 151.9, 154.5, 154.9, 157.2, 161.9, 168.2, 194.3. HRMS: m/z[M - H]⁺ рассчитано для C₃₁H₃₀BrN₇O₈: 706.1255, найдено: 706.1261.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-дихлорбензоил)-4-бромфенокси]этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат ацикловира (**14g**), выход 23%. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): 3.75-3.78 (2H, м, CH₂O), 3.94-3.96 (2H, м, CH₂N), 4.22-4.24 (4H, м, 2xCH₂CH₂C=O), 4.55 (2H, с, NCH₂C=O), 5.40-5.43 (1H, д, J=12

Гц, H-5 Ura) , 5.45 (2H, c, OCH₂N), 7.00-7.02 (1H, д, J=8 Гц, H-6 Ura), 7.07-7.10 (1H, д, J=12 Гц, Ph), 7.45 (1H, м, Ph), 7.57-7.58 (2H, м, Ph), 7.63-7.64 (2H, м, Ph), 7.82 (1H, s, H-8). ¹³C NMR (100 МГц, DMSO-d₆): 14.4, 22.5, 23.1, 41.8, 64.4, 66.4, 72.3, 79.65, 99.8, 113.2, 115.6, 116.9, 128.0, 129.4, 132.0, 133.4, 135.2, 135.7, 138.0, 139.8, 145.0, 151.0, 151.9, 154.7, 155.09, 157.4, 161.9, 168.1, 191.8. HRMS: m/z[M - H]⁺ рассчитано для C₂₉H₂₄BrCl₂N₇O₈: 746.0163, найдено: 746.0177.

3.2. Общая методика синтеза производных 9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)аденина 15a-d

Смесь 9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)аденина (0,5 ммоль) и соответствующую [2,6-диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]уксусную кислоту (0,5 ммоль) дважды переупарили с ДМФА, затем снова растворили в 5 мл ДМФА и добавили 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (0,6 ммоль) и диметиламинопиридин (0,25 ммоль). Смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Затем растворитель упарили, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ:метанол 98:2. Выход целевых продуктов **15a–g** составил 56–84%.

9-(4'-[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-6-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетил-2'циклопентен-1'-ил)аденин (**15a**), выход 62%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.94 (3H, c, CH₃), 1.98-2.02 (1H, м, H5'a), 3.04-3.14 (1H, м, 5'Nb), 4.01-4.04 (2H, м, CH₂-N), 4.24-4.26 (2H, м, CH₂-O), 4.57-4.69 (2H, д, J = 3.2 Гц, CH₂CO), 5.25 (1H, c, H-5 Ura), 5.68-5.71 (1H, м, H4'), 5.81-5.83 (1H, м, H1'), 5.96 (2H, c, NH₂), 6.18-6.21 (1H, м, H3'), 6.32-6.36 (1H, м, H2'), 6.96-6.98 (1H, д, J = 8.1 Гц, HPh₂CO), 7.08-7.11 (1H, т, J = 7.9 Гц, HPh₂CO), 7.31 (1H, м, HPh₂CO), 7.40-7.45 (3H, м, HPh₂CO), 7.58-7.60 (1H, м, HPh₂CO), 7.77-7.79 (2H, д, J = 7.1 Гц, HPh₂CO), 7.84 (1H, c, H-8), 8.38 (1H, c, H2). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): 20.3, 38.4, 42.0, 44.8, 56.7, 66.0, 70.6,

78.2, 101.5, 112.3, 121.6, 128.5, 129.1, 129.9, 131.6, 133.6, 134.8, 135.0, 138.7, 152.7, 155.4, 161.1, 167.4.

9-(4'-[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетил-2'циклопентен-1'-ил)аденин (**15b**), выход 84% . ¹H NMR (400 МГц, CDCl₃): 1.74 (3H, c, CH₃), 1.97-2.03 (1H, м, H5'a), 3.07-3.12 (1H, м, 5'Hb), 3.91-3.96 (2H, м, CH₂-N), 4.19-4.21 (2H, м, CH₂-O), 4.60-4.72 (2H, д, *J* = 1.3 Гц, CH₂CO), 5.68-5.70 (1H, м, H4'), 5.80-5.82 (1H, м, H1'), 5.86 (2H, c, NH₂), 6.18-6.21 (1H, м, H3'), 6.33-6.35 (1H, м, H2'), 6.75 (1H, c, H6Ura), 6.94-6.96 (1H, д, *J* = 8.3 Гц, HPh₂CO), 7.08-7.11 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, HPh₂CO), 7.35 (1H, м, HPh₂CO), 7.44-7.50 (3H, м, HPh₂CO), 7.57-7.60 (1H, м, HPh₂CO) 7.82-7.84 (3H, м, HPh₂CO, H-8), 8.39 (1H, c, H2). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): 12.6, 38.4, 42.2, 48.9, 56.7, 66.3, 70.6, 78.2, 109.2, 112.3, 119.7, 121.3, 128.4, 129.9, 129.9, 132.2, 133.3, 135.1, 149.7, 151.0, 152.7, 155.3, 155.8, 163.0, 167.4, 195.4.

9-(4'-[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетил-2'циклопентен-1'-ил)аденин (**15c**), выход 58% . ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.99-2.02 (1H, м, H5'a), 2.37 (6H, c, 2×CH₃), 3.05-3.12 (1H, м, 5'Hb), 3.92-3.95 (2H, м, CH₂-N), 4.15-4.18 (2H, м, CH₂-O), 4.58-4.70 (2H, д, *J* = 3.0 Гц, CH₂CO), 5.33-5.35 (1H, д, 7.9 Гц, H-5 Ura), 5.70-5.72 (1H, м, H4'), 5.80-5.83 (1H, м, H1'), 5.85 (2H, c, NH₂), 6.21-6.22 (1H, м, H3'), 6.35 (1H, м, H2'), 6.60-6.63 (1H, д, 7.9 Гц, H-6 Ura), 6.87-6.90 (1H, д, *J* = 8.8 Гц, HPh₂CO), 7.27-7.33 (3H, м, HPh₂CO), 7.34-7.40 (3H, м, HPh₂CO), 7.84 (1H, c, HPh₂CO) 7.82-7.84 (3H, м, HPh₂CO, H-8), 8.39 (1H, c, H2). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): 21.2, 38.4, 41.9, 49.0, 56.7, 66.8, 70.6, 78.3, 100.8, 113.7, 126.8, 127.5, 129.4, 131.5, 134.8, 135.0, 135.5, 137.2, 138.5, 138.7, 143.8, 151.1, 152.8, 154.1, 155.2, 161.9, 167.2, 194.4.

9-(4'-[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H))-ил]ацетил-2'циклопентен-1'-ил)аденин (**15d**), выход 56%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 1.74 (3H, c, CH₃), 2.01-2.06 (1H,

м, H5'a), 2.37 (6H, с, 2×CH₃), 3.05-3.08 (1H, м, 5'Hb), 3.94-3.96 (2H, м, CH₂-N), 4.18-4.19 (2H, м, CH₂-O), 4.65-4.68 (2H, д, $J = 7.4$ Гц, CH₂CO), 5.70-5.72 (1H, м, H4'), 5.80-5.82 (1H, м, H1'), 6.20-6.23 (1H, м, H3'), 6.38-6.40 (1H, м, H2'), 6.76 (2H, с, NH₂), 6.89-6.92 (1H, д, $J = 8.8$ Гц, H-6 Ura), 7.26-7.29 (3H, м, HPh₂CO), 7.40-7.41 (3H, м, HPh₂CO), 7.94 (1H, с, H-8), 8.37 (1H, с, H2). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): 12.6, 38.4, 42.2, 48.8, 57.1, 66.9, 70.6, 78.1, 109.3, 113.9, 119.3, 126.5, 127.7, 129.3, 131.5, 134.4, 135.5 x 2, 138.4, 139.7, 140.4, 149.3, 149.6, 151.1, 153.9, 154.3, 163.0, 167.4, 194.5.

3.3. Общая методика синтеза производных 5'-нораристеромицина 16a-d

К раствору 0,3 ммоль соответствующего производного 9-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1'-ил)аденина **15a-d** в 10 мл смеси диоксан : вода 10:1 добавили четырехокись осмия (0,01 ммоль) и оксид N-метилморфолина (2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. Затем растворители упарили, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ:метанол 95:5. Выход целевых продуктов **16 a-g** составил 43–65%.

[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-6-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат 5'-нораристеромицина (**16a**), выход 60%. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃:CD₃OD): 1.91 (3H, с, CH₃), 2.16-2.24 (1H, м, H5'a), 2.92-3.03 (1H, м, 5'Hb), 3.99-4.02 (2H, м, CH₂-N), 4.14-4.15 (1H, м, H4'), 4.20-4.23 (2H, м, CH₂-O), 4.46-4.50 (1H, м, H1'), 4.56-4.61(2H, м, CH₂CO), 4.79-4.82 (1H, м, H3'), 5.06-5.09 (1H, м, H2'), 5.24 (1H, с, H-5 Ura), 6.96-6.99 (1H, м, HPh₂CO), 7.03-7.08 (1H, м, HPh₂CO), 7.25-7.36 (1H, д, $J = 5.8$ Гц, HPh₂CO), 7.40-7.43 (3H, д, $J = 7.9$ Hz, HPh₂CO), 7.52-7.55 (1H, м, HPh₂CO) 7.73-7.75 (2H, д, $J = 7.2$ Hz, HPh₂CO), 7.99 (1H, с, H-8), 8.25 (1H, с, H-2). ¹³C NMR (100 МГц, CDCl₃:CD₃OD): 20.1, 33.1, 42.0, 44.8, 59.1, 65.7, 74.3, 75.6, 100.9, 112.3, 121.3, 128.5, 129.0, 129.9, 131.6, 131.8, 133.8, 136.7, 139.6, 151.6, 152.0, 152.1, 155.5, 161.8, 167.3. HRMS: m/z[M +nH]⁺ рассчитано для C₃₂H₃₁N₇O₈: 642.2307,

найдено: 642.2292; $m/z[M + nNa]^+$ рассчитано для $C_{32}H_{31}N_7O_8$: 664.2126, найдено: 664.2112.

[2,6-Диоксо-3-[(2-бензоилфенокси)этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат 5'-нораристеромицина (**16b**), выход 43%. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3:CD_3OD$): 1.65 (3H, с, CH_3), 2.05-2.12 (1H, м, H5'a), 2.69-2.78 (1H, м, 5'Hb), 3.85-3.87 (2H, м, CH_2-N), 3.95-3.96 (1H, м, H4'), 4.19-4.22 (2H, т, $J = 4.9$ Гц, CH_2-O), 4.55-4.59 (2H, м, CH_2CO), 4.84-4.86 (1H, м, H1'), 5.20-5.22 (1H, д, $J = 6.6$ Гц, H3'), 5.31 -5.33 (1H, д, $J = 4.2$ Гц, H2'), 7.02 (1H, с, H-5 Ura), 7.10-7.18 (1H, м, HPh_2CO), 7.02-7.07 (1H, м, HPh_2CO), 7.30-7.33 (1H, м, HPh_2CO), 7.42-7.47 (3H, м, HPh_2CO), 7.61-7.68 (3H, м, HPh_2CO), 8.13-8.15 (2H, д, $J = 5.6$ Гц, H-8, H-2). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3:CD_3OD$): 12.3, 33.1, 42.2, 59.1, 65.1, 70.3, 74.2, 109.0, 112.4, 121.3, 128.4, 129.9, 132.3, 133.5, 137.4, 139.8, 140.9, 151.1, 152.0, 155.4, 155.8, 163.4, 167.4, 196.4. HRMS: $m/z[M + nH]^+$ рассчитано для $C_{32}H_{31}N_7O_8$: 642.2307, найдено: 642.2304; $m/z[M + nNa]^+$ рассчитано для $C_{32}H_{31}N_7O_8$: 664.2126, найдено: 664.2126.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат 5'-нораристеромицина (**16c**), выход 65%. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$): 2.07-2.12 (1H, м, H5'a), 2.30 (6H, с, $2 \times CH_3$), 2.69-2.74 (1H, м, 5'Hb), 3.87-3.90 (2H, м, CH_2-N), 3.93-3.97 (1H, м, H4'), 4.17-4.19 (2H, м, CH_2-O), 4.47-4.52 (2H, д, $J = 10.7$ Гц, CH_2CO), 4.73-4.76 (1H, м, H1'), 5.20-5.23 (1H, д, $J = 6.6$ Гц, H3'), 5.32-5.36 (2H, с, H2', H-5 Ura), 6.96-6.99 (1H, д, $J = 7.9$ Гц, H-6 Ura), 7.17 (2H, с, NH_2), 7.22-7.29 (4H, м, HPh_2CO), 7.35 (1H, м, HPh_2CO), 7.53-7.57 (1H, м, HPh_2CO), 8.13-8.15 (2H, д, $J = 6.5$ Гц, H-2, H-8). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMSO-d_6$): 21.2, 33.1, 48.6, 58.4, 66.5, 70.3, 74.1, 74.6, 77.7, 79.6, 99.8, 115.4, 119.9, 125.6, 127.4, 128.6, 131.0, 131.7, 135.7, 136.9, 138.5, 140.6, 144.9, 150.1, 151.0, 152.7, 154.4, 156.5, 162.0, 167.7, 194.4. HRMS: $m/z[M + nH]^+$ рассчитано для $C_{33}H_{32}ClN_7O_8$: 690.2074, найдено: 690.2053.

[2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетат 5'-нораристеромицин (**16d**), выход 57%. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 1.64 (3H, с, CH₃), 2.06-2.11 (1H, м, H5'a), 2.29 (6H, с, 2×CH₃), 2.66-2.73 (1H, м, 5'Hb), 3.88-3.89 (2H, м, CH₂-N), 3.95-3.97 (1H, м, H4'), 4.20-4.21 (2H, д, *J* = 4.8 Гц, CH₂-O), 4.48-4.53 (2H, м, CH₂CO), 4.73-4.76 (1H, м, H1'), 5.21-5.23 (1H, д, *J* = 6.6 Гц, H3'), 5.32-5.33 (1H, д, *J* = 4.3 Гц, H2'), 7.02 (1H, с, H-6 Ura), 7.18 (2H, с, NH₂), 7.24-7.28 (4H, м, HPh₂CO), 7.32-7.33 (1H, д, *J* = 2.7 Гц, HPh₂CO), 7.53-7.57 (1H, м, HPh₂CO), 8.13-8.15 (2H, д, *J* = 7.1 Гц, H-2, H-8). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆): 12.6, 21.2, 33.3, 42.3, 48.4, 58.4, 66.4, 70.3, 74.1, 74.7, 77.6, 107.41, 115.6, 119.9, 125.5, 127.4, 128.5, 131.1, 131.7, 135.7, 136.8, 138.4, 140.6, 141.2, 150.1, 150.8, 152.7, 154.4, 156.5, 162.2, 167.7, 194.2. HRMS: m/z[M + nH]⁺ рассчитано для C₃₄H₃₄ClN₇O₈: 704.2230, найдено: 704.2217.

3.4. Гидролиз производных ацикловира и 5'-нораристеромицина эстеразой печени свиньи

Гидролиз соединений исследовали в 40 мкл 50 мМ трис-HCl буфера с pH 8.2, содержащего 250 мМ NaCl, 6 мМ CaCl₂, 8 ед/тест эстеразы, 2 мМ соединения **14d** или **16d** в метаноле. Реакции проводили при 37°C в течение 0–30 ч. Реакционную смесь анализировали с помощью ТСХ в системе хлороформ-этанол 4:1 для **14d** (R_f продуктов гидролиза: 0.8 (**14d**), 0.2 (**13d**), 0.29 (ACV)) или хлороформ-этанол 9:1 для **16d** (R_f продуктов гидролиза: 0.5 (**16d**), 0.12 (**13d**), 0.14 (5'-нораристеромицин)). 2,6-Диоксо-3-[(2-[2-(3,5-диметилбензоил)-4-хлорфенокси]этил]-5-метил-3,6-дигидропиримидин и **13d**, 5'-нораристеромицин, ACV использовали в качестве контролей.

3.5. Синтез 3-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-6-октилфуоро[2,3-d]пиримидин-2(3H)-она (17)

К 5-йоддезоксипуридину (200 мг, 0.54 ммоль), растворённому в ацетонитриле, добавили децин-1 (1.2 экв.), палладий на угле (0.01 экв.), йодид меди (I) (0.02 экв.) и триэтиламин (10 экв.). Реакцию кипятили в течении 3 часов с

обратным холодильником. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя сначала системой $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 97:3, а затем $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5. Выход составил 63%. ^1H ЯМР (DMSO-d_6): 0.84-0.88 (3H, т, $J = 16$ Гц, CH_3 , октил), 1.19 -1.26 (12H, м, $6 \times \text{CH}_2$), 2.01-2.07 (1H, м, 2'б CH), 2.37-2.45 (1H, м, 2'а CH), 2.60-2.65 (2H, $J = 20$ Гц, т, αCH_2 , октил), 3.58-3.72 (1H, м, 5'CH), 3.87-3.93 (1H, м, 3'CH), 4.21-4.26 (2H, м, 4'CH), 5.32-5.55 (1H, д, $J = 12$ Гц, H-5, Ura), , 5.07-5.10 (1H, т, $J = 12$ Гц, 5'OH), 5.25-5.27 (1H, д, $J = 8$ Гц, 3'OH), 6.15-6.20 (1H, т, $J = 20$ Гц, 1'CH), 6.43 (1H, с, H^6 , Fyro), 8.67 (1H, с, H^6 , Pyr).

3.6. Общая методика синтеза фуранопиримидиновых производных 18а-с

Эквимольное количество (0,156 ммоль) аналога дезоксирибонуклеозида и соответствующего производного уксусной кислоты переупарили в ДМФА (3 мл), растворили в ДМФА (3 мл) и добавили диметиламинопиридин (0.5 экв) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1.2 экв). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ, элюировали системой хлороформ-метанол 9:1. Целевой продукт выделяли препаративной хроматографией на 2 мм пластине с силикагелем в системе хлороформ-метанол 9:1.

((2R,3S,5R)-3-гидрокси-5-(6-октил-2-оксофуоро[2,3-*d*]пиримидин-3(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)-метил-2-(3-(2-(4-хлоро-2-(3,5-диметилбензоил)феноксипропил)этил)-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)ацетат (**18a**) ^1H ЯМР (DMSO-d_6): 0.82-0.86 (3H, т, $J = 16$ Гц, CH_3 , октил), 1.21-1.28 (12H, м, $6 \times \text{CH}_2$), 2.01-2.07 (1H, м, 2'б CH), 2.27 (6H, с, $2 \times \text{CH}_3$), 2.37-2.45 (1H, м, 2'а CH), 2.60-2.65 (2H, $J = 20$ Гц, т, αCH_2 , октил), 3.86-3.89 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.09-4.12 (1H, м, 3'CH), 4.17-4.24 (4H, м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2 + \text{NCH}_2\text{C(O)}$), 4.30-4.37 (1H, м, 4'CH), 4.43-4.58 (2H, м, 5'CH), 5.32-5.55 (1H, д, $J = 12$ Гц, H-5, Ura), 6.17-6.21 (1H, т, $J = 12$ Гц, 1'CH), 6.43 (1H, с, H^6 , Fyro), 6.96-7.00 (1H, д, $J = 16$ Гц, H-6, Ura), 7.22-7.29 (4H, м, Ph), 7.33-7.36 (1H, м, Ph), 7.53-7.59 (1H, м, Ph), 8.33 (1H, с, H^6 , Pyr). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6): 14.38,

21.12, 22.51, 26.84, 27.84, 28.83, 29.02, 29.08, 29.44, 31.68, 35.56, 41.22, 41.94, 42.61, 48.46, 54.54, 65.10, 66.50, 70.42, 84.96, 87.92, 99.83, 100.41, 107.25, 115.42, 125.59, 127.42, 128.61, 131.02, 131.75, 135.67, 136.71, 136.91, 138.43, 144.97, 151.04, 154.46, 158.82, 161.97, 168.17, 171.80, 194.13.

((2R,3S,5R)-3-гидрокси-5-(6-октил-2-оксофуоро[2,3-d]пиримидин-3(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)-метил-2-(3-(2-(4-хлоро-2-(3,5-диметилбензоил)фенокси)этил)-4-метил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)ацетат (**18b**) ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 0.81-0.86 (3H, т, J = 20 Гц, CH₃, октил), 1.18-1.30 (12H, м, 6xCH₂), 1.89 (3H, с, CH₃, Ura), 2.02-2.11 (1H, м, 2'б CH), 2.25 (6H, с, 2xCH₃), 2.38-2.46 (1H, м, 2'а CH), 2.60-2.65 (2H, J = 20 Гц, т, αCH₂, октил), 3.92-3.96 (2H, м, CH₂CH₂N), 4.08-4.12 (1H, м, 3'CH), 4.18-4.24 (4H, м, OCH₂CH₂ + NCH₂C(O)), 4.31-4.37 (1H, м, 4'CH), 4.45-4.60 (2H, м, 5'CH), 5.27 (1H, с, H-5, Ura), 6.17-6.21 (1H, т, J = 12 Гц, 1'CH), 6.44 (1H, с, H⁶, Fyro), 7.21-7.25 (4H, м, Ph), 7.31-7.32 (1H, м, Ph), 7.52-7.56 (1H, м, Ph), 8.34 (1H, с, H⁶, Pyr). ¹³C ЯМР (DMSO-d₆): 14.37, 19.87, 21.11x2, 22.51, 26.86, 27.85, 28.83, 29.02, 29.09, 31.69, 41.18, 41.97, 44.56, 65.07, 66.58, 70.27, 79.68, 84.97, 87.95, 100.40, 100.50, 107.22, 115.27, 125.63, 127.44, 128.27, 131.14, 131.52, 135.82, 136.47, 136.77, 138.48, 151.61, 153.92, 154.20, 154.39, 158.80, 160.88, 168.22, 171.79, 194.43.

((2R,3S,5R)-3-гидрокси-5-(6-октил-2-оксофуоро[2,3-d]пиримидин-3(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)-метил-2-(3-(2-(4-хлоро-2-(3,5-диметилбензоил)фенокси)этил)-5-метил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил)ацетат (**18c**) ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 0.81-0.86 (3H, т, J = 20 Гц, CH₃, октил), 1.21-1.28 (12H, м, 6xCH₂), 1.62 (3H, с, CH₃, Thy), 2.00-2.09 (1H, м, 2'б CH), 2.26 (6H, с, 2xCH₃), 2.38-2.45 (1H, м, 2'а CH), 2.60-2.64 (2H, J = 16 Гц, т, αCH₂, октил), 3.84-3.88 (2H, м, CH₂CH₂N), 4.09-4.13 (1H, м, 3'CH), 4.19-4.27 (4H, м, OCH₂CH₂ + NCH₂C(O)), 4.30-4.37 (1H, м, 4'CH), 4.43-4.60 (2H, м, 5'CH), 5.49 (1H, с, H-5, Ura), 6.17-6.21 (1H, т, J = 12 Гц, 1'CH), 6.45 (1H, с, H⁶, Fyro), 7.03 (1H, с, Ph), 7.24-7.31 (4H, м, Ph), 7.53-7.57 (1H, м, Ph), 8.33 (1H, с,

H⁶, Pyr). ¹³C ЯМР (DMSO-d₆): 12.65, 14.37. 21.14x2, 22.51, 26.79, 27.83, 28.82, 29.02, 29.09, 31.68, 41.27, 42.21, 48.24, 65.10, 66.59, 70.50, 85.01, 87.98, 100.44, 107.26, 107.54, 115.61, 125.57, 127.40, 128.51, 131.06, 131.69, 135.59, 136.68x2, 138.35x2, 141.24, 150.86, 154.46, 158.78, 162.76, 168.26, 171.79, 194.12.

4. Общая методика синтеза 5-замещённых производных уридина **19a-g**

К 5-бромуридину, растворенному в смеси воды (4 мл) и метанола (2 мл), прилили раствор бороната (1 экв) в ТГФ (4 мл), продули аргоном. Добавили катализатор тетракси(трифенилфосфин)палладий (0.1 экв) и гидроксид натрия (10 экв). Реакционную массу кипятили 7 часов, затем упарили, растворили в хлороформе (15 мл) и экстрагировали водой (15 мл). Водную фракцию промыли хлороформом (2 x 5 мл), сконцентрировали и выделяли целевое вещество колоночной хроматографией на RP-18, элюировали водой. Выход продуктов **19a-g** составил 37-59%.

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-5-(пиридин-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (**19a**), светло-желтые кристаллы, 41%. ¹H ЯМР (CD₃OD): 3.76-3.95 (2H, м, H5'), 4.06-4.08 (1H, м, H4'), 4.25-4.28 (2H, м, H3', H2'), 5.98-5.99 (1H, д, H1'), 7.43-7.47 (1H, м, H5 Py), 8.06-8.10 (1H, м, H4 Py), 8.44-8.46 (1H, д, H6 Py), 8.49 (1H, с, H6), 8.77-8.78 (1H, д, H2 Py). ¹³C ЯМР (D₂O): 60.13, 68.90, 74.08, 83.73, 90.03, 112.46, 123.94, 130.12, 137.44, 139.19, 147.62, 147.98, 155.05, 169.10

5-(3-аминофенил)-1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (**19b**), серые кристаллы, 37% ¹H NMR (CD₃OD): 3.77-3.87 (2H, м, H5'), 4.02-4.04 (1H, м, H4'), 4.19-4.27 (2H, м, H3', H2'), 5.96-5.98 (1H, д, H1'), 6.63-6.67 (1H, м, Ph), 6.89-6.96 (2H, м, Ph), 7.06-7.11 (1H, д, Ph), 7.92 (1H, с, H6). ¹³C ЯМР (D₂O): 60.52, 69.24, 73.91, 83.65, 89.93, 115.55, 116.35, 116.54, 129.41, 135.44, 138.07, 146.09, 157.63, 172.64

5-(4-аминофенил)-1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (**19c**), бежевые кристаллы, 39% ¹H ЯМР (CD₃OD): 3.71-3.90 (2H, м, H5'), 4.00-4.02 (1H, м, H4'), 4.18-4.27 (2H, м, H3', H2'), 5.95-5.97 (1H, д, H1'), 6.72-6.75 (2H, м, Ph), 7.28-7.33 (2H, м, Ph), 7.82 (1H, с, H6). ¹³C ЯМР (CD₃OD): 60.38, 69.26, 74.00, 83.81, 90.15, 114.39 x 2, 122.53, 128.55 x 2, 130.78, 135.88, 148.32, 150.88, 165.91

4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)бензамид (**19d**), жёлтые кристаллы, 53% ¹H ЯМР (D₂O): 3.72-3.91 (2H, м, H5'), 4.06-4.10 (1H, м, H4'), 4.20-4.24 (1H, т, H3'), 4.30-4.33 (1H, т, H2'), 5.93-5.94 (1H, д, H1'), 7.52-7.56 (2H, м, Ph), 7.77-7.80 (2H, м, Ph), 7.92 (1H, с, H6). ¹³C ЯМР (D₂O): 56.95, 59.84, 66.08, 73.54, 83.07, 89.60, 114.88, 127.01, 128.33, 130.84 x 2, 138.32, 138.45, 157.62, 163.24, 172.51

N-(4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)ацетамид (**19e**), белые кристаллы, 57% ¹H ЯМР (D₂O): 2.13 (3H, с, CH₃), 3.71-3.88 (2H, м, H5'), 4.04-4.08 (1H, м, H4'), 4.18-4.22 (1H, т, H3'), 4.29-4.32 (1H, т, H2'), 5.92-5.94 (1H, д, H1'), 7.39 (4H, с, Ph), 7.78 (1H, с, H6). ¹³C ЯМР (D₂O): 22.34, 56.93, 60.00, 68.70, 73.40, 83.08, 89.46, 115.41, 121.28, 128.25, 128.87, 129.25, 135.52, 137.57, 158.13, 165.77, 172.49

4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-N-метилбензамид (**19g**), белые кристаллы, 54% ¹H ЯМР (D₂O): 2.91 (3H, с, CH₃), 3.73-3.92 (2H, м, H5'), 4.06-4.11 (1H, м, H4'), 4.21-4.25 (1H, т, H3'), 4.31-4.34 (1H, т, H2'), 5.94-5.95 (1H, д, H1'), 7.51-7.55 (2H, м, Ph), 7.71-7.73 (2H, м, Ph), 7.91 (1H, с, H6). ¹³C ЯМР (D₂O): 26.39, 48.90, 60.31, 69.05, 74.05, 83.57, 90.08, 115.38, 127.01, 127.52, 128.84, 138.25, 138.79, 157.81, 163.24, 171.13, 172.67

ВЫВОДЫ

1. Разработан дизайн и методы синтеза шести новых липофильных депо-форм AZT. Исследована стабильность полученных соединений в плазме крови кролика, а также произведена оценка их фармакокинетических параметров в плазме крови кролика и крысы и лимфе крысы, показана способность высвобождать AZT.
2. Осуществлён синтез 21 гетеродимерного соединения, в которых один фрагмент отвечает за ингибирование ОТ ВИЧ, а другой подавляет репликацию сопутствующих вирусов – ЦМВ, ВПГ, Варицелла-Зостер и вируса Вакцинии. Проведена оценка их стабильности, антивирусной активности и цитотоксичности.
3. Для группы гетеродимерных соединений, содержащих НИОТ ВИЧ (AZT или ЗТС) и нуклеозидный ингибитор репликации ЦМВ, показана способность эффективно ингибировать ВИЧ и ЦМВ в культурах клеток и коинфицированных тканях.
4. Предложен метод синтеза шести 5-замещённых производных уридина («обратных флексимеров»), в качестве потенциальных ингибиторов репликации SARS-CoV-2. Показано, что эти соединения не обладают соответствующей антивирусной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abet V. et al. Prodrug approach: An overview of recent cases //European journal of medicinal chemistry. – 2017. – Т. 127. – С. 810-827.
2. Lesniewska-Kowiel M. A., Muszalska I. Strategies in the designing of prodrugs, taking into account the antiviral and anticancer compounds //European journal of medicinal chemistry. – 2017. – Т. 129. – С. 53-71.
3. Takalani F. et al. Lipid–drug conjugates and associated carrier strategies for enhanced antiretroviral drug delivery //Pharmaceutical development and technology. – 2020. – Т. 25. – №. 3. – С. 267-280.
4. Aljuffali I. A. et al. The codrug approach for facilitating drug delivery and bioactivity //Expert opinion on drug delivery. – 2016. – Т. 13. – №. 9. – С. 1311-1325.
5. Karaman R. Prodrugs Design Based on Inter-and Intramolecular Chemical Processes //Chemical biology & drug design. – 2013. – Т. 82. – №. 6. – С. 643-668.
6. Jordheim L. P. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases //Nature reviews Drug discovery. – 2013. – Т. 12. – №. 6. – С. 447-464.
7. Iglesias L. E. et al. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs //Biotechnology advances. – 2015. – Т. 33. – №. 5. – С. 412-434.
8. Li F., Maag H., Alfredson T. Prodrugs of nucleoside analogues for improved oral absorption and tissue targeting //Journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – Т. 97. – №. 3. – С. 1109-1134.
9. Zhang Y. et al. Current prodrug strategies for improving oral absorption of nucleoside analogues //Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Т. 9. – №. 2. – С. 65-74.

10. Mehellou Y., De Clercq E. Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go? //J. Med. Chem. – 2010. – T. 53. – №. 2. – C. 521-538.
11. Hurwitz S. J., Schinazi R. F. Prodrug strategies for improved efficacy of nucleoside antiviral inhibitors //Current opinion in HIV and AIDS. – 2013. – T. 8. – №. 6. – C. 556.
12. Giacalone G., Hillaireau H., Fattal E. Improving bioavailability and biodistribution of anti-HIV chemotherapy //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2015. – T. 75. – C. 40-53
13. Thornton P. J. et al. Nucleoside phosphate and phosphonate prodrug clinical candidates: Miniperspective //Journal of medicinal chemistry. – 2016. – T. 59. – №. 23. – C. 10400-10410.
14. Pertusati F., Serpi M., McGuigan C. Medicinal chemistry of nucleoside phosphonate prodrugs for antiviral therapy //Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 2012. – T. 22. – №. 5. – C. 181-203.
15. Heidel K. M., Dowd C. S. Phosphonate prodrugs: an overview and recent advances //Future medicinal chemistry. – 2019. – T. 11. – №. 13. – C. 1625-1643.
16. Schultz C. Prodrugs of biologically active phosphate esters //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2003. – T. 11. – №. 6. – C. 885-898.
17. Pradere U. et al. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs //Chemical reviews. – 2014. – T. 114. – №. 18. – C. 9154-9218.
18. Lefebvre I. et al. Mononucleoside phosphotriester derivatives with S-acyl-2-thioethyl bioreversible phosphate-protecting groups: intracellular delivery of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine 5'-monophosphate //Journal of medicinal chemistry. – 1995. – T. 38. – №. 20. – C. 3941-3950.
19. Hwang Y., Cole P. A. Efficient synthesis of phosphorylated prodrugs with bis (POM)-phosphoryl chloride //Organic letters. – 2004. – T. 6. – №. 10. – C. 1555-1556.

20. Marcellin P. et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen–positive chronic hepatitis B //New England Journal of Medicine. – 2003. – T. 348. – №. 9. – C. 808-816.
21. Kirby S. A., Dowd C. S. Phosphoryl prodrugs: characteristics to improve drug development //Medicinal Chemistry Research. – 2021. – C. 1-10.
22. Wiemer A. J., Wiemer D. F. Prodrugs of phosphonates and phosphates: crossing the membrane barrier //Phosphorus chemistry I. – 2014. – C. 115-160.
23. Mackman R. L. et al. Synthesis and anti-HIV activity of cyclic pyrimidine phosphonmethoxy nucleosides and their prodrugs: a comparison of phosphonates and corresponding nucleosides //Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. – 2007. – T. 26. – №. 6-7. – C. 573-577.
24. Peyrottes S. et al. SATE pronucleotide approaches: an overview //Mini reviews in medicinal chemistry. – 2004. – T. 4. – №. 4. – C. 395-408.
25. Schlienger N. et al. Mononucleoside phosphorodithiolates as mononucleotide prodrugs //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – C. 113914.
26. Meier C., Balzarini J. Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules //Antiviral research. – 2006. – T. 71. – №. 2-3. – C. 282-292.
27. Roy B. et al. Recent trends in nucleotide synthesis //Chemical Reviews. – 2016. – T. 116. – №. 14. – C. 7854-7897.
28. Morales E. H. R. et al. Linear Synthesis of Chiral CycloSal-Pronucleotides. – 2011 – C. 4397-4408.
29. Rios Morales E. H., Balzarini J., Meier C. Stereoselective synthesis and antiviral activity of methyl-substituted CycloSal-pronucleotides //Journal of medicinal chemistry. – 2012. – T. 55. – №. 16. – C. 7245-7252.
30. Görbig U., Balzarini J., Meier C. New Cyclo AMB-Nucleoside Phosphonate Prodrugs //Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. – 2007. – T. 26. – №. 6-7. – C. 831-834.

31. Gisch N., Balzarini J., Meier C. Studies on enzyme-cleavable dialkoxymethyl-cyclo Saligenyl-2', 3'-dideoxy-2', 3'-didehydrothymidine monophosphates //Journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 51. – №. 21. – C. 6752-6760.
32. Meier C. et al. Esterase-cleavable cycloSal-pronucleotides—the trapping concept //Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 2015. – T. 7. – C. 105-113.
33. Imagawa D. et al. A phase I/II study to assess the safety, tolerability and pharmacokinetics (PK) of intravenous (IV) infusion of MB07133 in subjects with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) //Cancer Research. – 2007. – T. 67. – №. 9 Supplement. – C. 2649-2649.
34. Wang P. et al. Recent advances in small molecule prodrugs for cancer therapy //Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2014. – T. 14. – №. 3. – C. 418-439.
35. Mehellou Y. The Protides boom //ChemMedChem. – 2016. – T. 11. – №. 11. – C. 1114.
36. Slusarczyk M., Serpi M., Pertusati F. Phosphoramidates and phosphoramidates (ProTides) with antiviral activity //Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 2018. – T. 26. – C. 2040206618775243.
37. Mehellou Y., Rattan H. S., Balzarini J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic: Miniperspective //Journal of medicinal chemistry. – 2017. – T. 61. – №. 6. – C. 2211-2226.
38. Ross B. S. et al. Synthesis of diastereomerically pure nucleotide phosphoramidates //The Journal of organic chemistry. – 2011. – T. 76. – №. 20. – C. 8311-8319.
39. Serpi M. et al. Synthesis of phosphoramidate prodrugs: ProTide approach //Current protocols in nucleic acid chemistry. – 2013. – T. 53. – №. 1. – C. 15.5. 1-15.5. 15.
40. Cholongitas E., Papatheodoridis G. V. Sofosbuvir: a novel oral agent for chronic hepatitis C //Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology. – 2014. – T. 27. – №. 4. – C. 331.

41. Lawitz E. et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection //New England Journal of Medicine. – 2013. – T. 368. – №. 20. – C. 1878-1887.
42. De Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) //Biochemical pharmacology. – 2016. – T. 119. – C. 1-7.
43. Weinschenk L. et al. Bis (benzoyloxybenzyl)-DiPPro Nucleoside Diphosphates of AntiHIV Active Nucleoside Analogues //ChemMedChem. – 2015. – T. 10. – №. 5. – C. 891-900.
44. Jessen H. J. et al. Bioreversible protection of nucleoside diphosphates //Angewandte Chemie International Edition. – 2008. – T. 47. – №. 45. – C. 8719-8722.
45. Pertenbreiter F., Balzarini J. and Meier C// Nucleoside mono- and diphosphate prodrugs of 2',3'-dideoxyuridine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrouridine// Chem Med Chem. – 2015. – T.10. – C. 94–106
46. Meier C. Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs—An unsolvable task? //Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 2017. – T. 25. – №. 3. – C. 69-82.
47. Schulz T., Balzarini J., Meier C. The DiPPro approach: synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs //ChemMedChem. – 2014. – T. 9. – №. 4. – C. 762-775.
48. Weinschenk L. et al. Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides //Journal of medicinal chemistry. – 2015. – T. 58. – №. 15. – C. 6114-6130.
49. Bonnaffé D. et al. Synthesis of acyl pyrophosphates. Application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs //Tetrahedron letters. – 1995. – T. 36. – №. 4. – C. 531-534.
50. Gollnest T. et al. Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals //Nature communications. – 2015. – T.

51. Gollnest T. et al. Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues // *Angewandte Chemie*. – 2016. – T. 128. – №. 17. – C. 5341-5344.
52. Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J. Prodrugs—from serendipity to rational design // *Pharmacological reviews*. – 2011. – T. 63. – №. 3. – C. 750-771.
53. Paul K. et al. Drug–lipid conjugates for enhanced oral drug delivery // *AAPS PharmSciTech*. – 2019. – T. 20. – №. 2. – C. 1-11.
54. Dahan A. et al. The prospects of lipidic prodrugs: an old approach with an emerging future // *Future Medicinal Chemistry*. – 2019. – T. 11. – №. 19. – C. 2563-2571.
55. Markovic M. et al. Lipidic prodrug approach for improved oral drug delivery and therapy // *Medicinal research reviews*. – 2019. – T. 39. – №. 2. – C. 579-607.
56. Ravetti S. et al. Synthesis and anti-HIV activity of novel 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine prodrugs // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2009. – T. 17. – №. 17. – C. 6407-6413.
57. Gualdesi M. S., Briñón M. C., Quevedo M. A. Intestinal permeability of lamivudine (3TC) and two novel 3TC prodrugs. Experimental and theoretical analyses // *European journal of pharmaceutical sciences*. – 2012. – T. 47. – №. 5. – C. 965-978.
58. Krečmerová M. et al. N4-Acyl derivatives as lipophilic prodrugs of cidofovir and its 5-azacytosine analogue, (S)-HPMP-5-azaC: Chemistry and antiviral activity // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2014. – T. 22. – №. 10. – C. 2896-2906.
59. Liu J. et al. Highly enhanced leukemia therapy and oral bioavailability from a novel amphiphilic prodrug of cytarabine // *RSC advances*. – 2016. – T. 6. – №. 42. – C. 35991-35999.
60. Sun B. et al. Chemotherapy agent-unsaturated fatty acid prodrugs and prodrug-nanoplatforms for cancer chemotherapy // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – T. 264. – C. 145-159.
61. Bergman A. M. et al. Antiproliferative activity, mechanism of action and oral antitumor activity of CP-4126, a fatty acid derivative of gemcitabine, in in vitro

- and in vivo tumor models //Investigational new drugs. – 2011. – T. 29. – №. 3. – C. 456-466.
62. Adema A. D. et al. Metabolism and accumulation of the lipophilic deoxynucleoside analogs elacytarabine and CP-4126 //Investigational new drugs. – 2012. – T. 30. – №. 5. – C. 1908-1916.
63. Mandal A. et al. Design of lipophilic prodrugs to improve drug delivery and efficacy //Current drug targets. – 2016. – T. 17. – №. 15. – C. 1773-1798.
64. Lanier E. R. et al. Development of hexadecyloxypropyl tenofovir (CMX157) for treatment of infection caused by wild-type and nucleoside/nucleotide-resistant HIV //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – T. 54. – №. 7. – C. 2901-2909.
65. Yáñez J. A. et al. Intestinal lymphatic transport for drug delivery //Advanced drug delivery reviews. – 2011. – T. 63. – №. 10. – C. 923-942.
66. Tso P. et al. Effect of mono-and diglycerides on the digestion and absorption of lutein in lymph fistula rats //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2018. – T. 315. – №. 1. – C. G95-G103.
67. Kindel T., Lee D. M., Tso P. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons //Atherosclerosis Supplements. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 11-16.
68. Han S. et al. Profiling the role of deacylation-reacylation in the lymphatic transport of a triglyceride-mimetic prodrug //Pharmaceutical research. – 2015. – T. 32. – №. 5. – C. 1830-1844.
69. Hu L. et al. Glyceride-mimetic prodrugs incorporating self-immolative spacers promote lymphatic transport, avoid first-pass metabolism, and enhance oral bioavailability //Angewandte Chemie. – 2016. – T. 128. – №. 44. – C. 13904-13909.
70. Zaro J. L. Lipid-based drug carriers for prodrugs to enhance drug delivery //The AAPS journal. – 2015. – T. 17. – №. 1. – C. 83-92.
71. Lonshakov D. V. et al. Synthesis and properties of 3'-azido-3'-deoxythymidine derivatives of glycerolipids //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2011. – T. 44. – №. 10. – C. 557-563.

72. Kurz M., Scriba G. K. E. Drug–phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization, and degradation by pancreatic phospholipase A2 //Chemistry and physics of lipids. – 2000. – T. 107. – №. 2. – C. 143-157.
73. Markovic M. et al. Prospects and challenges of phospholipid-based prodrugs //Pharmaceutics. – 2018. – T. 10. – №. 4. – C. 210.
74. Markovic M. et al. Molecular modeling-guided design of phospholipid-based prodrugs //International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – T. 20. – №. 9. – C. 2210.
75. Piantadosi C. et al. Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity //Journal of medicinal chemistry. – 1991. – T. 34. – №. 4. – C. 1408-1414.
76. Alexander R. L. et al. Synthesis and cytotoxic activity of two novel 1-dodecylthio-2-decyloxypropyl-3-phosphatidic acid conjugates with gemcitabine and cytosine arabinoside //Journal of medicinal chemistry. – 2003. – T. 46. – №. 19. – C. 4205-4208.
77. Pickin K. A. et al. Phospholipid/deoxycytidine analogue prodrugs for the treatment of cancer //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2009. – T. 19. – №. 1. – C. 31-36.
78. Radwan A. A., Alanazi F. K. Targeting cancer using cholesterol conjugates //Saudi pharmaceutical journal. – 2014. – T. 22. – №. 1. – C. 3-16.
79. Radwan A. A., Alanazi F. K. Design and synthesis of new cholesterol-conjugated 5-fluorouracil: a novel potential delivery system for cancer treatment //Molecules. – 2014. – T. 19. – №. 9
80. Dalpiaz A. et al. Zidovudine and ursodeoxycholic acid conjugation: design of a new prodrug potentially able to bypass the active efflux transport systems of the central nervous system //Molecular Pharmaceutics. – 2012. – T. 9. – №. 4. – C. 957-968.
81. Quevedo M. A., Briñón M. C. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine //Antiviral research. – 2009. – T. 83. – №. 2. – C. 103-111.

82. Trevaskis N. L., Charman W. N., Porter C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update //Advanced drug delivery reviews. – 2008. – T. 60. – №. 6. – C. 702-716.
83. Novikov M. S. et al. Synthesis and anti-HCMV activity of 1-[ω -(phenoxy) alkyl] uracil derivatives and analogues thereof //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – T. 21. – №. 14. – C. 4151-4157.
84. Freitas V. R. et al. Efficacy of ganciclovir in combination with zidovudine against cytomegalovirus in vitro and in vivo //Antiviral research. – 1993. – T. 21. – №. 4. – C. 301-315.
85. Vanpouille C. et al. A new antiviral: Chimeric 3TC–AZT phosphonate efficiently inhibits HIV-1 in human tissues ex vivo //Antiviral research. – 2014. – T. 109. – C. 125-131.
86. Delany S. et al. Impact of aciclovir on genital and plasma HIV-1 RNA in HSV-2/HIV-1 co-infected women: a randomised placebo-controlled trial in South Africa //AIDS (London, England). – 2009. – T. 23. – №. 4. – C. 461.
87. Duff P. Prevention of opportunistic infections in women with HIV infection //Clinical Obstetrics and Gynecology. – 2019. – T. 62. – №. 4. – C. 816-822.
88. Munawwar A., Singh S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, their role in HIV transmission, and disease progression //Journal of laboratory physicians. – 2016. – T. 8. – №. 01. – C. 005-018.
89. Novikov M. S. et al. 1-[2-(2-Benzoyl-and 2-benzylphenoxy) ethyl] uracils as potent anti-HIV-1 agents //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2011. – T. 19. – №. 19. – C. 5794-5802.
90. Prokofjeva M. M. et al. Benzophenone derivatives of pyrimidines as effective non-nucleoside inhibitors of wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase //Doklady. Biochemistry and Biophysics. – Springer Nature BV, 2012. – T. 447. – №. 1. – C. 280.
91. Leporati A. et al. 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.
92. Elion G. B. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity //Journal of medical virology. – 1993. – C. 2-6.
93. Matyugina E. S., Khandazhinskaya A. L. 5'-Norcarbocyclic nucleoside analogs //Russian Chemical Bulletin. – 2014. – T. 63. – №. 5. – C. 1069-1080.
94. Kiekens A. et al. HIV and SARS-CoV-2: the interplay of two wicked problems //BMJ Global Health. – 2022. – T. 7. – №. 8. – C. e009105.
95. Bhaskaran K, Rentsch CT, MacKenna B, et al. HIV infection and COVID-19 death: a population-based cohort analysis of UK primary care data and linked national death registrations within the OpenSAFELY platform. Lancet HIV 2021; C. e24–32
96. Peters H. L. et al. Design, synthesis and evaluation of a series of acyclic fleximer nucleoside analogues with anti-coronavirus activity //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2015. – T. 25. – №. 15. – C. 2923-2926.
97. Zimmermann S. C. et al. “Reverse” carbocyclic fleximers: synthesis of a new class of adenosine deaminase inhibitors //Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – 2013. – T. 32. – №. 3. – C. 137-154.