



УДК 577.113.3:547.854.4'455.562.057

© 1993 А. А. Арзуманов, Н. Б. Дяткина,
М. К. Куханова, А. А. Краевский, Ф. М. Семченко*,
О. Г. Еремин*, Б. И. Мартынов*

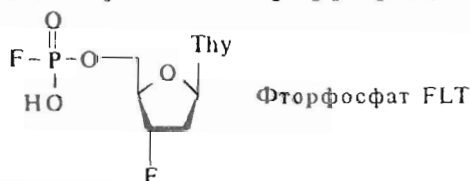
3'-ФТОР-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИН-5'-ФТОРФОСФАТ — ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва;
* Государственный НИИ органической химии и технологии, Москва*

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, ингибитор репродукции, 3'-фтор-3'-дезокситимидин-5'-фторфосфат.

Осуществлен синтез 3'-фтор-3'-дезокситимидин-5'-фторфосфата и показана его высокая активность в подавлении репродукции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в клеточных культурах. Это соединение открывает новую группу потенциальных антиретровирусных агентов — 5'-фторфосфатов нуклеозидов.

Проблема поиска новых ингибиторов репродукции ВИЧ становится еще более острой из-за чрезвычайно высокой способности этого вируса к мутациям и, как следствие, быстрого возникновения резистентности вируса к уже используемым лекарствам [1]. 3'-Фтор-3'-дезокситимидин (FLT) в течение нескольких лет исследовался в Мемориальном Слоан Кеттеринг онкологическом центре Нью-Йорка в качестве возможного препарата против СПИДа, но клиническое изучение его на больных людях показало его высокую токсичность и он не был разрешен для лечения. В то же время на большом количестве модифицированных нуклеозидов [2—5], в том числе FLT [6], было показано, что введение в их молекулы модифицированных фосфатных остатков значительно снижает их токсичность, хотя во многих случаях (но не во всех) это приводит и к понижению активности. С целью поиска активных и малотоксичных препаратов продолжен синтез новых нуклеотидов, модифицированных по сахарному остатку и фосфатной группе. В данной работе описано получение FLT-фторфосфата,



который показал высокую активность в подавлении продукции ВИЧ в культурах клеток H9 и PBL, близкую к таковой для FLT. Так, в клетках H9 50% подавление продукции вируса наблюдается при концентрации FLT-фторфосфата 0,3 мкМ и FLT 0,2 мкМ, а в PBL — 4 и 2 нМ соответственно, причем соединения проявили примерно одинаковую токсичность для обоих типов клеток. Испытания

Сокращения: FLT — 3'-фтор-3'-дезокситимидин, PBL — периферические лимфоциты крови человека.

проведены в Мемориальном Слоан Кеттеринг онкологическом центре Нью-Йорка, и авторы приносят д-ру Брюсу Польски благодарность.

В настоящее время известны различные способы получения фторфосфатов нуклеозидов [7—12]. Наши попытки использовать ДСС для конденсации FLT с фторфосфатом бис(три-*n*-бутиламмония) аналогично работе [12] позволили получить лишь следовые количества фторфосфата FLT. Поэтому мы использовали более эффективный конденсирующий агент — 1-(2-мезитилсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазол и установили, что реакция завершается за 15 мин.

Фторфосфат FLT оказался стабилен в 0,5 н. NaOH в течение 7 сут. Кроме того, изучалась его устойчивость к действию фосфатаз из плаценты человека и кишок телят по методике, опубликованной в работе [13]. Оказалось, что 5'-монофосфаты FLT и тимидина, взятые в качестве контрольных проб, гидролизвались полностью до соответствующих нуклеозидов за 5 мин, в то время как 5'-фторфосфаты FLT и тимидина были устойчивы в течение 3 ч.

Однако следует отметить, что только изучение токсичности и метаболизма фторфосфата FLT на животных и анти-ВИЧ-активности на человеке может показать, имеет ли это соединение какие-либо преимущества по сравнению с FLT.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР записывали на приборе Bruker Spectrospin в D₂O с рабочей частотой 250 МГц и *трет*-бутиловым спиртом в качестве внутреннего стандарта для ¹H-ЯМР-спектров и с рабочей частотой 101,27 МГц и 85% H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта для ³¹P-ЯМР-спектров. Константы спин-спинового взаимодействия P—H определяли на основании двойного гетероядерного резонанса.

ФАВ-Масс-спектры выполняли на спектрометре Kratos MS 50TC; ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck).

3'-Фтор-3'-дезокситимидин-5'-фторфосфат. Раствор 1,43 г (10 ммоль) ди-натриевой соли фторфосфорной кислоты (Aldrich) в 30 мл воды пропускали через колонку (3×20 см) с даэксом 50 (H⁺), добавляли 30 мл пиридина и 4,77 мл (20 ммоль) три-*n*-бутиламина и упаривали. Остаток повторно упаривали с пиридином (5×5 мл) и растворяли в 20 мл диметилформамида. Полученный 0,5 М раствор бис(три-*n*-бутиламмониевой) соли фторфосфорной кислоты (3 мл) и 750 мг (2,5 ммоль) 1-(2-мезитилсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазола прибавляли к раствору 244 мг (1 ммоль) FLT в 10 мл пиридина. Смесь выдерживали при 20° С, контролируя ход реакции ТСХ в системе хлороформ — метанол (9:1). Когда весь исходный нуклеозид превратился в соединение с нулевой подвижностью (15 мин), реакционный раствор выливали в 250 мл воды и пропускали через колонку (3×25 см) с DEAE-Тоуорpearl (HCO₃⁻). Колонку промывали водой до исчезновения УФ-поглощения элюата, а затем в линейном градиенте концентрации NH₄HCO₃ от 0 до 0,2 М (рН 7,5) (общий объем 600 мл). Фракции, содержащие фторфосфат, упаривали и очищали дополнительно на колонке (1,5×20 см) с силикагелем LiChrospher RP-18 (40—63 мкм, Merck) в воде. После упаривания получали 312 мг (91%) аммониевой соли 5'-фторфосфата FLT в виде пены.

R_f в системе изопропанол — 25% NH₄OH — вода (7:1:2) составил 0,63; в системе изопропанол — метанол — 25% NH₄OH — хлороформ (4:4:1:1) — 0,76. УФ-спектр (вода): λ_{max} 267 нм (ε 9800).

¹H-ЯМР (δ, м. д., J, Гц): 7,80кв (H-6, 1H, J_{H6,CH3} 1,0); 6,48дд (H-1', 1H, J_{1',2'a} 5,0, J_{1',2'b} 9,0); 5,48м (H-3', 1H, J_{3',F} 52,5); 4,60м (H-4', 1H, J_{4',F} 25,0); 4,18—4,12м (H-5'a, b, 2H), 2,74м (H-2'a, 1H, J_{2'a,3'} < 0,5, J_{2'a,F} 21,0); 2,48м (H-2'b, 1H, J_{2'b,3'} 5,0, J_{2'b,F} 41,0, J_{2'a,2'b} 15,0); 1,98д (CH₃, 3H).

³¹P-ЯМР (δ, м. д., J, Гц): —6,88м (J_{P,F} 934,3, ³J_{P,H-5'} 4,82, ⁴J_{P,H-4'} 3,0).

Масс-спектр (m/z): 327 (M⁺ + 1 — NH₃).

Вычислено, %: С 36,82, Н 4,02, N 8,59. C₁₀H₁₃F₂N₂O₆P. Найдено, %: С 36,63, Н 4,24, N 8,81.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краевский А. А.//Молекулярн. биология. 1992. Т. 26. № 4. С. 725—744.
2. Тарусова Н. Б., Хорлин А. А., Краевский А. А., Корнеева М. Н., Носик Д. Н., Круглов Н. В., Галегов Г. А., Бибилашвили Р. Ш.//Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716—1723.
3. Карамов Э. В., Лукашов В. В., Тарусова Н. Б., Корнилаева Г. В., Родина М. А., Куханова М. К., Краевский А. А.//Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 6. С. 1695—1701.
4. Карамов Э. В., Лукашов В. В., Горбачева А. П., Макарова Т. В., Корнилаева Г. В., Тарусова Н. Б., Краевский А. А.//Молекулярн. биология. 1992. Т. 26. № 1. С. 201—207.
5. Tarusova N. B., Kukhanova M. K., Kravetsky A. A., Karamov E. V., Lukashov V. V., Kornilayeva G. V., Rodina M. A., Galegov G. A.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1—3. P. 351—354.
6. Kravetsky A. A., Tarusova N. B., Zhu Q.-Y., Vidal P., Chou T.-C., Baron P., Polsky B., Jiang X.-J., Matulic-Adamic J., Rosenberg I., Watanabe K. A.//Nucleosides and Nucleotides. 1992. V. 11. № 2. P. 177—196.
7. Wittman R.//Chem. Ber. 1963. B. 96. S. 771—779.
8. Eckstein F., Bruns W., Parmeggiani A.//Biochemistry. 1975. V. 14. P. 5225—5231.
9. Sund Ch., Chattopadhyaya J.//Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 7523—7530.
10. Dabkowski W., Cramer F., Michalski J.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. P. 3001—3302.
11. Dabkowski W., Cramer F., Michalski J.//J. Chem. Soc. Perkin Trans I. 1992. P. 1442—1452.
12. Nichol A. W., Nomura A., Hampton A.//Biochemistry. 1967. V. 6. P. 1008—1015.
13. Куханова М. К., Тарусова М. К., Ясько М. В., Арзуманов А. А., Гудима С. О., Краевский А. А., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш.//Молекулярн. биология. 1992. Т. 26. № 4. С. 1148—1159.

Поступила в редакцию
30.III.1993

После доработки
26.V.1993

*A. A. Arzumanov, N. B. Dyatkina, M. K. Kukhanova,
A. A. Kravetsky, F. M. Semchenko*, O. G. Yeremin*,
B. I. Martynov**

3'-FLUORO-3'-DEOXYTHYMIDINE 5'-PHOSPHOROFUORIDATE IS AN EFFECTIVE INHIBITOR OF HIV REPRODUCTION IN CELL CULTURES

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow;*

** Research Institute of Organic Chemistry and Technology, Moscow*

3'-Fluoro-3'-deoxythymidine 5'-phosphorofluoridate was synthesised and shown to effectively inhibit the HIV reproduction in cell cultures, thus opening a new group of potential antiretroviral nucleoside derivatives.