



УДК 577.115.3:578.232:547.295.8

## НОВЫЙ ОКСААНАЛОГ МИРИСТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПОДАВЛЯЮЩИЙ РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

© 1995 г. Е. Л. Водовозова, И. И. Михалёв, А. А. Ржанинова\*,  
М. М. Гараев\*, Юл. Г. Молотковский

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Поступила в редакцию 25.11.94 г.

Синтезирован ряд оксааналогов миристиновой кислоты, вещества исследованы на противовирусную активность в культуре клеток МТ4, зараженных вирусом иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1). Полученные кислоты не оказывают токсического воздействия на неинфицированные клетки МТ4 при концентрации 100 мкМ. 14,14,14-Трифтор-12-оксатетрадекановая кислота существенно ингибирует размножение ВИЧ-1 (подавление репродукции вирусного антигена на 75%), другие кислоты – (7Z)-13-, (9Z)-13- и (7Z)-11-оксатетрадеценонная – противовирусного действия не оказывают.

*Ключевые слова:* ингибиторы ретровирусов, анти-ВИЧ-соединения, N-миристоилирование белков, миристоил-СоА: протеин-N-миристоилтрансфераза, оксааналог миристиновой кислоты, ингибиторы миристоилирования вирусспецифических белков.

В работах последних лет показано, что многие мембранные белки имеют липидные якоря, к числу которых относится и миристинат (тетрадеканонат) (см., например, обзор [1]). Удаление липидных якорей или изменение их структуры приводит к нарушению функционирования этих мембранных белков. Эукариотическая миристоил-СоА: протеин-N-миристоилтрансфераза (далее – миристоилтрансфераза, КФ 2.3.1.97) катализирует сопряжающую трансляцию [2] миристоилирование N-концевого остатка глицина ряда клеточных, вирусных и онкобелков [1, 3]. Сайт-специфический мутагенез остатков Gly<sup>1</sup> в полипептидах Pr55<sup>gag</sup> вируса иммунодефицита человека 1 [4] и Pr65<sup>gag</sup> вируса лейкемии мышей [5] приводит к блокированию N-миристоилирования и протеолитического процессинга этих белков, что предотвращает их прикрепление к плазматической мембране, где осуществляется сборка вирусной частицы, и, таким образом, подавляет репликацию вируса.

Недавно Гордон и др. [6 - 12] показали, что репликация вирусов иммунодефицита человека и лейкемии мышей в культуре клеток CD4<sup>+</sup> лимфоцитов человека ингибируется аналогами миристиновой (тетрадекановой) кислоты, содержащими гетероатом (кислорода или серы) вместо одного из метиленовых звеньев, причем цитотоксического действия при этом не наблюдалось. Наиболее ак-

тивными оказались 13-окса- [6, 7] и 4-оксамиристиновая [8] кислоты. Эксперименты по изучению метаболизма 11-оксамиристиновой кислоты в культурах мышечной миоцитоподобной клеточной линии (BC<sub>3</sub>H1) [9] и клеточной линии COS из почек обезьяны [10] показали, что она проникает в клетку, ацилирует СоА с помощью СоА-лигазы и является субстратом для миристоилтрансферазы. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными в экспериментах *in vitro*, где изучалась субстратная специфичность миристоилтрансферазы из *Saccharomyces cerevisiae* в отношении природных жирных кислот с различной длиной алифатической цепи и ряда миристоильных аналогов, содержащих гетероатомы [11]. Авторы показали, что фермент специфичен в первую очередь к длине ацильной цепи, а не к ее гидрофобности. Также было установлено, что в молекуле фермента между центрами связывания ацил-СоА и пептида осуществляются кооперативные взаимодействия. В той же лаборатории синтезировали ряд производных 13-оксамиристата, содержащих 2-E-двойную связь и гидроксигруппу или атом фтора в разных положениях молекулы [12]. Предполагалось, что эти дополнительные функции увеличат устойчивость кислоты к β-окислительному расщеплению и повысят ее анти-ВИЧ-активность. Однако ни одно из синтезированных веществ не было более активно по сравнению с 13-оксамиристатом. Пиджен и сопр. [13] показали также, что ингибирующее влияние гетероаналогов миристината на репликацию ВИЧ-1

Сокращения: ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1; СоА – коэнзим А; РМА – фосфорномолибденовая кислота; DNPН – 2,4-динитрофенилгидразин.

*in vitro* усиливается, если остаток этого аналога входит в состав фосфолипида. Так, фосфатидилэтаноламин, ацилированный двумя остатками 13-оксамиристиновой кислоты, оказался более чем в 40 раз активнее самой кислоты.

Для более детального изучения субстратной специфичности и структуры центра связывания миристоила в молекуле миристоилтрансферазы Гордон и сотр. [14, 15] синтезировали широкий набор аналогов миристиновой кислоты, включающий производные, содержащие один, два или три гетероатома (O и/или S), *цис*- или *транс*-двойные связи, тройную связь, фенильную, фурильную, тиенильную и циклогексильную группы в различных положениях и комбинациях вдоль алифатической цепи. Авторы делают предположение, что углеводородная цепь миристоил-CoA располагается в гидрофобном кармане миристоилтрансферазы следующим образом: а) в районе C4 - C7 алифатическая цепь имеет изгиб, б) последовательность первых 4 или 5 атомов ацильной цепи находится в вытянутой конформации, в) концевые атомы углерода взаимодействуют с неким участком центра связывания ацил-CoA, который имеет форму конуса и проявляет избирательность в отношении длины и пространственных характеристик ацильной цепи [15].

Ингибирующее ВИЧ действие некоторых аналогов миристиновой кислоты, очевидно, заключается в том, что они являются приемлемыми субстратами для миристоилтрансферазы, однако остатки этих кислот не способны удерживать белки ВИЧ в мембране [6, 9]. По-видимому, введение в миристоильный остаток полярных функций – в данном случае решающий фактор.

Мы также предприняли поиск новых нецитотоксических ингибиторов ВИЧ – оксааналогов миристиновой кислоты. С этой целью нами были синтезированы кислоты (VI), (X), (XVI), содержащие Z-двойную связь и атом кислорода в различных положениях алифатической цепи, а также кислота (XVII) с трифторметильной группой в  $\omega$ -положении и оксагруппой вместо C12 (схемы 1 - 4).

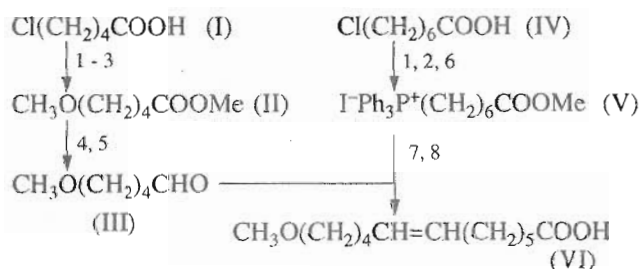
(7Z)-13-Оксатетрадеценовую кислоту (VI) получали исходя из 5-хлорпентановой (I) и 7-хлор-

гептановой (IV) кислот (схема 1). Метильный эфир 5-хлорпентановой кислоты превращали в соответствующий иодид, который по реакции Вильямсона переводили в 5-метоксипроизводное (II), которое затем восстанавливали алюмогидридом лития; полученный спирт окисляли до альдегида (III) хлорхроматом пиридиния [16]. Из 7-хлоргептановой кислоты (IV) через метильный эфир 7-иодгептановой кислоты получали трифенилфосфониевую соль (V), которую вводили в реакцию Виттига с альдегидом (III) в тетрагидрофуране, используя в качестве основания гексаметилдисульфид натрия. В этих условиях из алифатических карбонилсодержащих соединений образуются преимущественно Z-олефины [17]. После омыления образовавшегося эфира получали кислоту (VI) (схема 1).

Аналогичным образом была получена (7Z)-11-оксатетрадеценовая кислота (X) (схема 2). 3-Бромпропионовая кислота (VII) после этерификации была по реакции Вильямсона переведена в метил-3-пропоксипропионат (VIII), восстановление которого алюмогидридом и последующее окисление OH-группы хлорхроматом пиридиния привело к 3-пропоксипропанолу (IX). Последний был введен в реакцию Виттига с фосфониевой солью (V) в указанных выше условиях; после омыления сложноэфирной группы продукта реакции была выделена кислота (X).

В синтезе (9Z)-13-оксатетрадеценовой кислоты (XVI) (схема 3) исходили из 3-бромпропанола (XI); O-метилирование его проводили действием диазометана и эфирата трехфтористого бора, получали 3-метоксипропилбромид (XII), который переводили в фосфониевую соль (XIII). Из нее и 8-метоксикарбониллоктанала (XV) (получен из метил-9-иоднонаноата (XIV)) по описанному выше варианту реакции Виттига была синтезирована кислота (XVI).

Z-Конфигурацию двойной связи в кислотах (X) и (XVI) доказывает присутствие в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР их метильных эфиров сигналов обоих олефиновых протонов в области 5.3 - 5.5 м. д. с константой спин-спинового взаимодействия приблизительно 10 Гц (см. "Экспериментальную часть").



1 – MeOH, H<sup>+</sup>; 2 – MeCOEt, NaI; 3 – MeONa, DMSO; 4 – LiAlH<sub>4</sub>; 5 – CrO<sub>3</sub> · HCl · Py;  
6 – PPh<sub>3</sub>, MeCN; 7 – NaN(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 8 – а) Pr<sup>t</sup>OH, NaOH, б) H<sup>+</sup>; 9 – CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ONa

Схема 1.

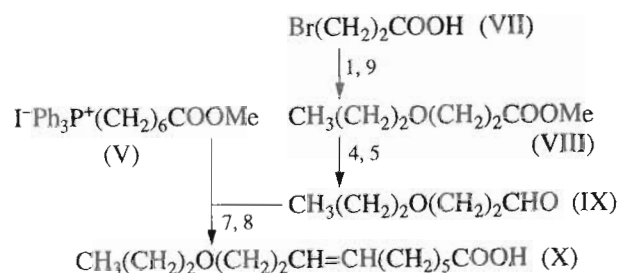


Схема 2.

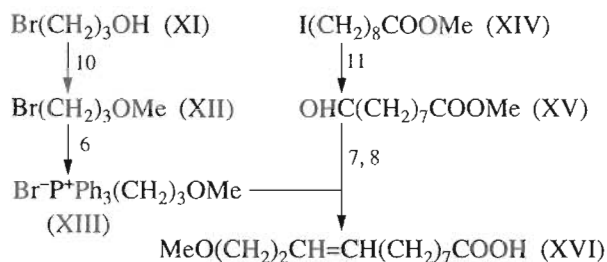
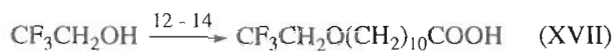


Схема 3.



Реагенты 6, 7, 8 – см. схемы 1, 2.

10 –  $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ; 11 –  $\text{Me}_3\text{NO}$ ; 12 – Na;

13 –  $\text{Br}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ ; 14 –  $\text{H}^+$

Схема 4.

В спектре эфира кислоты (VI) протоны при двойной связи не дали отдельных сигналов, однако Z-конфигурация в этом случае подтверждается данными ИК-спектроскопии – присутствием полосы поглощения при  $730 \text{ см}^{-1}$  и отсутствием поглощения в области  $960 - 970 \text{ см}^{-1}$ ; подобные же ИК-спектры имеют и эфиры кислот (X) и (XVI), для которых Z-конфигурация подтверждена данными  $^1\text{H}$ -ЯМР. Следует заметить, что в той же области спектра могут располагаться полосы маятниковых колебаний метиленовых групп. Однако в спектре метилового эфира 13-оксамиристиновой кислоты заметного поглощения в этой области нет (данные не приведены), что позволяет приписать полосу при  $730 \text{ см}^{-1}$  в спектре эфира кислоты (VI) Z-двойной связи.

14,14,14-Трифтор-12-оксатетрадекановую кислоту (XVII) получали реакцией Вильямсона из 2,2,2-трифторэтилата натрия и 11-бромундекановой кислоты (схема 4).

Синтезированные нами аналоги миристиновой кислоты (VI), (X), (XVI), (XVII) были исследованы на противовирусную активность в культуре клеток МТ4, зараженных ВИЧ-1, по модифицированной методике [6]. В качестве отрицательного (неактивного) контрольного вещества использовали миристиновую кислоту. Образцом для сравнения была выбрана 13-оксамиристиновая (13-оксатетрадекановая) кислота, которая проявила наибольшую противовирусную активность среди испытанных кислот строения  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $m + n = 11$ , X = O или S) [6]. Согласно литературным данным, эта кислота при концентрации 20 - 40 мкМ ингибирует развитие ВИЧ-1 на 90 - 95% от контроля и при максимально испытанной концентрации (100 мкМ) не оказывает токсического действия на лимфоциты [6].

Результаты проведенных нами испытаний суммированы в таблице. Как следует из представленных данных, в концентрации 100 мкМ аналоги (VI, X, XVI), содержащие двойную связь, не проявили противовирусной активности, в то время как трифторкислота (XVII) и 13-оксатетрадекановая кислота вызывали подавление репродукции вирусного антигена на 33 - 75%. Сравнение ингибирующей активности этих препаратов между собой показывает, что более эффективна трифторкислота (таблица). Полученные нами значения уровня ингибирующей активности 13-оксатетрадекановой кислоты отличаются от данных, приведенных ранее [6]. Эти различия, возможно, связаны с разной множественностью инфекции и особенностями штаммов ВИЧ-1, использованных в работе.

Необходимо отметить, что ни одно из изученных нами соединений не обладало токсическим действием на клетки МТ4, о чем свидетельствовали эксперименты по измерению уровня включения  $^3\text{H}$ тимидина в присутствии и без добавления химиопрепаратов (данные не приводятся).

#### Анти-ВИЧ-активность оксааналогов миристиновой кислоты\*

Вещество (кислота)	Титр вируса в супернатанте <sup>2*</sup> ( $10^4$ СОЕ/мл)	Содержание антигена р24 ( $P$ , нг/мл)		Ингибирование репродукции антигена р24, % <sup>3*</sup>			
		Дни после заражения					
		3	5	7	3	5	7
Миристиновая (тетрадекановая)	2.0	>0.03	150.0	209.3	0	0	0
13-Оксатетрадекановая	н/о <sup>4*</sup>	>0.03	96.8	140.6	0	35.5	33.1
(7Z)-13-Оксатетрадеценная (VI)	2.0	н/о			0		
(7Z)-11-Оксатетрадеценная (X)	2.0	н/о			0		
(9Z)-13-Оксатетрадеценная (XVI)	2.0	н/о			0		
14,14,14-Трифтор-12-оксатетрадекановая (XVII)	$0.8 \times 10^{-2}$	>0.03	37.5	109.3	0	75	47.9

\* Концентрация в культуральной среде 100 мкМ. <sup>2\*</sup> Определен в пробах на 5-е сут после инфицирования; СОЕ – синцитиеобразующие единицы. <sup>3\*</sup> Содержание антигена р24 в контроле (миристиновая кислота) ( $P_k$ ) принимали за 100%,

ингибирование рассчитывали по формуле  $\frac{P_k - P}{P_k} 100$ . <sup>4\*</sup> н/о – не определяли.

Отсутствие противовирусного эффекта в случае кислот (VI), (X), (XVI), вероятно, может служить еще одним доказательством гипотетической модели гидрофобной полости миристоилтрансферазы, которая была предложена ранее [15]. Как было уже отмечено, между звеньями C4 и C7 ацильной цепи миристоилового остатка, находящегося в центре связывания фермента, предполагается наличие изгиба. Полученные нами кислоты (VI), (X), (XVI) содержат *цис*-двойные связи в положениях C7–C8 или C9–C10, что, видимо, не способствует их укладке в гидрофобной полости фермента.

Синтезированная нами трифторкислота (XVII) является, очевидно, подходящим субстратом для миристоилтрансферазы, а содержащаяся в ее молекуле  $\omega$ -трифторэтоксигруппа не позволяет ацилированному вирусному белку удерживаться в клеточной мембране, и процесс сборки вирусной частицы нарушается. Эта кислота представляется потенциальным кандидатом для получения нового лекарственного средства против СПИДа и других заболеваний, возбуждаемых ретровирусами, зависящими от N-миристоилирования белков.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали 3-бромпропионовую кислоту, ч. ("Реахим"); 11-бромундекановую кислоту, трифенилфосфин и 2,2,2-трифторэтанол (Fluka, Швейцария); 3-бромпропанол, флоризил, DMSO (Merck, Германия); N-метил-N-нитрозо-*п*-толуолсульфамид (Aldrich, США). Хлорхромат пиридиния [16], гексаметилдисульфид натрия [18], 5-хлорпентановую, 7-хлоргептановую и 9-хлорнонановую кислоты [19], 13-оксатетрадекановую кислоту [11] и триметиламиноксид [20] получали так, как описано ранее. Сухие эфиры и THF получали перегонкой над алюмогидридом лития, 2,2,2-трифторэтанол – над пятиокисью фосфора.

Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–63 мкм, Merck), для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 (Merck) в системах толуол-этилацетат–CH<sub>3</sub>COOH, 92 : 7 : 1 (А), бензол-этилацетат, 20 : 1 (Б); обнаружение с помощью РМА или DNPН.

Температуры плавления определены на блоке Кофлера и исправлены. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали в CDCl<sub>3</sub> на приборе Bruker WM-500, ИК-спектры – на спектрофотометре Hitachi 270-30 (Япония), масс-спектры – на спектрометре Varian MAT 44S (США), энергия ионизирующих электронов 70 эВ. ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex 334 (США); колонка – Separon SGX C<sub>18</sub>, 10 мкм (Tessek, Чехия), подвижная фаза – вода-метанол (1 : 4), скорость элюирования 1 мл/мин, детектирование по оптической плотности элюата при 254 нм.

**Метилловый эфир 5-иодпентановой кислоты.** 5-Хлорпентановую кислоту (I) (273 г, 2 моль) рас-

творяли в 1.5 л 0.5 н. HCl в метаноле (получали при добавлении 55 мл SOCl<sub>2</sub> к 1.5 л сухого метанола). Смесь оставляли на 12 ч при 20°C, затем отгоняли большую часть метанола, остаток нейтрализовали сухим K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, понемногу добавляя воду. Метилловый эфир 5-хлорпентановой кислоты экстрагировали смесью *n*-пентан-эфир, 1 : 1. Экстракт промывали раствором соды, водой, насыщенным водным NaCl, сушили MgSO<sub>4</sub>, фильтровали, упаривали, остаток перегоняли в вакууме. Получали 240 г метил-5-хлорпентаноата в виде бесцветной жидкости. Выход 85%, т. кип. 80–90°C/3 кПа. 133 г (0.88 моль) пентаноата кипятили 20 ч в 1 л сухого метилэтилкетона, содержащего 158 г (1.05 моль) безводного иодида натрия. Отгоняли из реакционной смеси около 2/3 растворителя, остаток охлаждали, разбавляли 1 л эфира и промывали 5% тиосульфатом натрия, 5% NaHCO<sub>3</sub>, водой и насыщенным водным NaCl (по 150 мл), сушили MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали. Получали 204 г (95%) желтоватой жидкости, т. кип. 114–115°C/3 кПа (лит. данные [21]: т. кип. 104–111°C/1.1 кПа). Масс-спектр (*m/z*): 211 ([M – OMe]<sup>+</sup>), 115 ([M – I]<sup>+</sup>).

**Метилловый эфир 7-иодгептановой кислоты** синтезировали аналогично эфиру 5-иодпентановой кислоты из 7-хлоргептановой кислоты (IV), через ее метилловый эфир (выход 86%, бесцветная жидкость, т. кип. 122–127°C/3 кПа), после обработки которого NaI получали указанный эфир в виде желтоватого жидкого вещества (выход 95%), индивидуального хроматографически и совпадающего по подвижности в системе Б (обнаружение РМА), R<sub>f</sub> 0.6, с метилловым эфиром, полученным из аутентичной 7-иодгептановой кислоты [22].

**Метилловый эфир 5-метоксипентановой кислоты (II).** Металлический натрий (28 г, 1.22 г-атом) растворяли в 500 мл сухого метанола, раствор метилага натрия упаривали досуха, остаток еще дважды упаривали досуха с 50 мл бензола. К полученному метилату натрия добавляли 500 мл DMSO и по каплям при перемешивании и охлаждении на водяной бане добавляли 154 г (0.64 моль) метил-5-иодпентаноата, перемешивали 20 мин при 20°C и выливали реакционную смесь в 1 л охлажденной 1 н. HCl. Экстрагировали эфиром (3 × 500 мл), экстракт промывали 5% водным NaHCO<sub>3</sub>, водой и насыщенным раствором NaCl (по 150 мл), сушили MgSO<sub>4</sub>, упаривали и перегоняли в вакууме. Получали 21.2 г (25%) эфира (II) в виде бесцветной жидкости, т. кип. 75–80°C/3 кПа. Масс-спектр (*m/z*): 145 ([M – H]<sup>+</sup>), 113 ([M – H – CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>).

**5-Метоксипентаналь (III).** К суспензии алюмогидрида лития (4 г, 0.105 моль) в 200 мл сухого эфира прибавляли по каплям раствор 28 г (0.19 моль) метилового эфира (II) в 80 мл эфира, смесь кипятили 1 ч, охлаждали, остаток алюмогидрида лития разлагали ледяной водой. Добавляли

3 н.  $H_2SO_4$  до полного растворения осадка, эфирный слой отделяли, водную фазу дважды экстрагировали эфиром. Объединенный эфирный экстракт промывали раствором соды, водой, рассолом, сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали, упаривали и перегоняли. Получали 16.35 г 5-метоксипентанола (73%), т. кип. 160 - 169°C.

К раствору 45.2 г (0.21 моль) хлорхромата пиридиния в 280 мл хлористого метилена добавляли 16.4 г (0.14 моль) 5-метоксипентанола в 26 мл  $CH_2Cl_2$ , перемешивали 2 ч. Раствор сливали со смолистого осадка, последний растирали с эфиром (3 × 80 мл). Объединенный экстракт пропускали через колонку с 20 г флоризила, упаривали и перегоняли в вакууме. Получали около 10 г (61%) альдегида (III). Бесцветная жидкость, т. кип. 90 - 100°C/5 кПа.  $R_f$  0.27 (система Б, обнаружение DNPH). 2,4-Динитрофенилгидразон альдегида (III): т. пл. 69 - 71°C. Масс-спектр ( $m/z$ ): 296 ( $M^+$ ).

**6-Метоксикарбонилгексилтрифенилфосфонийодид (V).** Кипятили 7 ч 15 г (56 ммоль) метил-7-иодгептаноата и 16 г (65 ммоль) трифенилфосфина в 75 мл сухого ацетонитрила. Реакционную смесь упаривали и стеклообразную массу растирали с 70 мл сухого эфира. Из полученного раствора после кристаллизации получали 26.2 г (87%) соли (V) в виде бесцветных кристаллов, т. пл. 97 - 99°C. Найдено, %: С 58.97; Н 6.01. Вычислено, %: С 58.66; Н 5.68.

**(7Z)-13-Оксатетрадеценовая кислота (VI).** К 10 мл сухого THF, охлажденного до 0°C, добавляли 0.87 г (1.7 ммоль) фосфониевой соли (V), раствор 0.37 г (2 ммоль) гексаметилдисилазанида натрия в 10 мл сухого THF перемешивали 5 мин при 0°C, к оранжевому раствору добавляли по каплям 400 мкл альдегида (III). Перемешивали 1 ч при 20°C, подкисляли 1 н. HCl, экстрагировали пентаном (3 × 20 мл), экстракт упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе бензол-этилацетат (25 : 1). Получали 205 мг (42 %) (7Z)-метил-13-оксатетрадеценоата в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.55 (Б, РМА).  $^1H$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.): 1.36 - 1.43 (6H, м, H10 и H4-H5), 1.58 - 1.66 (4H, м, H11 и H3), 2.05 (4H, м, H6 и H9), 2.31 (2H, т, H2), 3.34 (3H, с, H14), 3.39 (2H, т, H12), 3.70 (3H, с,  $COOCH_3$ ), 5.36 (2H, м, H7 и H8). Масс-спектр ( $m/z$ ): 242 ( $M^+$ ), 210 ( $[M - CH_3OH]^+$ ), 178 ( $[M - 2 \times CH_3OH]^+$ ). ИК (пленка,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3010 (C-H алкена), 1750 (сл. эфир), 1670 (C=C), 730 (C-H *цис*-алкена).

Раствор 112 мг (7Z)-метил-13-оксатетрадеценоата в 10 мл изопропанола кипятили 1.5 ч с 1 мл водного 5% NaOH, упаривали, остаток растворяли в 10 мл воды, нейтрализовали 2 н. HCl и экстрагировали гексаном (2 × 20 мл). Экстракт промывали водой и насыщенным NaCl (по 10 мл), упаривали. Получали 100 мг кислоты (VI) в виде

бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.42 (А, РМА).

**Метилловый эфир 3-бромпропионово́й кислоты** получали аналогично метиловым эфирам  $\omega$ -хлоркислот (I) и (IV) из 153 г (1 моль) 3-бромпропионово́й кислоты (VII). Выход 135.7 г (0.81%), т. кип. 57 - 58°C/3 кПа. Масс-спектр ( $m/z$ ): 168, 166 ( $M^+$ ), 135, 137 ( $[M - OMe]^+$ ), 107, 109 ( $[M - COOMe]^+$ ), 87 ( $[M - Br]^+$ ).

**Метилловый эфир 3-пропоксипропионово́й кислоты (VIII).** К 1 л охлажденного до 20°C раствора металлического натрия (18 г, 0.78 г-атом) в *n*-пропаноле добавляли по каплям 84 г (0.5 моль) метил-3-бромпропионата, перемешивали 1 ч и оставляли при 20°C. Через 12 ч реакционную смесь выливали в 4 л 1 н. HCl и экстрагировали смесью пентан-эфир, 1 : 1 (3 × 500 мл), экстракт промывали 5%  $NaHCO_3$ , водой, насыщенным NaCl (по 100 мл), сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали, упаривали и перегоняли. Получали 43 г (59%) эфира (VIII), т. кип. 85 - 90°C/3 кПа.

**3-Пропоксипропаналь (IX)** получали так, как описано для 5-метоксипентанала (III). Метил-3-пропоксипропионат (VIII) (43 г, 0.3 моль) восстанавливали алюмогидридом лития (6.1 г, 0.16 моль) и получали 25.5 г (73%) 3-пропоксипропанола, т. кип. 110 - 112°C/3 кПа. Последний (14.2 г, 0.12 моль) окисляли хлорхроматом пиридиния (38.8 г) в 240 мл дихлорметана и получали 6.9 г (51 %) 3-пропоксипропанала (IX), т. кип. 77 - 85°C/13 кПа,  $R_f$  0.31 (Б, DNPH). 2,4-Динитрофенилгидразон альдегида (IX): т. пл. 105 - 107°C; масс-спектр,  $m/z$ : 296 ( $M^+$ ).

**(7Z)-11-Оксатетрадеценовая кислота (X).** К 30 мл охлажденного до -20°C раствора фосфониевой соли (V) (2.61 г, 4.9 ммоль) в сухом THF добавляли по каплям раствор 1.11 г (6 ммоль)  $NaN(SiMe_3)_2$  в 30 мл сухого THF. Полученную оранжевую суспензию перемешивали 10 мин, охлаждали до -78°C и добавляли к ней 0.6 мл (5 ммоль) альдегида (IX). Смесь перемешивали 10 мин при -78°C и 1 ч при 20°C, затем обрабатывали так, как описано для (7Z)-метил-13-оксатетрадеценоата, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе гексан-эфир (20 : 1). Получали 415 мг (7Z)-метил-11-оксатетрадеценоата в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.60 (Б, РМА).  $^1H$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.): 0.94 (3H, т, H14), 1.37 (4H, м, H4 и H5), 1.66 (4H, м, H3 и H13), 2.05 (2H, м, H6), 2.33 (4H, м, H2 и H9), 3.43 (4H, м, H10 и H12), 3.70 (3H, с,  $COOCH_3$ ), 5.39 (1H, дт, H7,  $J_{6,7}$  7.2,  $J_{7,8}$  10.2 Гц), 5.44 (1H, дт, H8,  $J_{7,8}$  10.2,  $J_{8,9}$  7 Гц). Масс-спектр ( $m/z$ ): 242 ( $M^+$ ), 182 ( $[M - C_3H_7OH]^+$ ), 150 ( $[M - CH_3OH - C_3H_7OH]^+$ ). ИК (пленка,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3010 (C-H алкена), 1750 (сл. эфир), 1670 (C=C), 730 (C-H *цис*-алкена).

200 мг (7Z)-метил-11-оксатетрадеценоата гидролизировали так, как описано при получении

кислоты (VI), и получали 166 мг (7Z)-11-оксатетрадеценной кислоты (X) в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.48 (А, РМА).

**Метиловый эфир 3-бромпропанола (XII)** синтезировали по описанной ранее методике [23]. Диазометан получали разложением 110 г N-метил-N-нитрозо-*n*-толуолсульфамида 25 г едкого кали в 40 мл воды и 125 мл спирта. 3-Бромпропанол (XI) (14 мл, 0.155 моль) растворяли в 20 мл эфира и добавляли 3 мл эфирата трехфтористого бора, смесь охлаждали до  $-10^\circ\text{C}$  и барботировали через нее дважды перегнаный диазометан. К реакционной смеси добавляли 2 мл уксусной кислоты, нейтрализовали 5%  $\text{NaHCO}_3$ , отделяли эфирный слой, водный слой экстрагировали 50 мл эфира. Объединенный эфирный экстракт промывали водой, насыщенным  $\text{NaCl}$ , сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, упаривали и перегоняли. Получали 5.15 г (22 %) соединения (XII), т. кип.  $130 - 133^\circ\text{C}$  (лит. данные [24]: т. кип.  $132 - 133^\circ\text{C}$ ).

**3-Метоксипропилтрифенилфосфонийбромид (XIII)** получали кипячением (15 ч) 5.15 г эфира (XII) и 10.5 г трифенилфосфина в 50 мл сухого ацетонитрила. Реакционную смесь упаривали и получали фосфониевую соль (XIII) в виде бесцветных кристаллов, т. пл.  $340 - 342^\circ\text{C}$ . Выход 11.8 г (88%). Найдено, %: С 63.93; Н 5.31. Вычислено, %: С 63.63; Н 5.82.

**8-Метоксикарбонилгексаноаль (XV)**. К триметиламиноксиду (10 г) добавляли 160 мл сухого ксилола (смесь изомеров) и медленно отгоняли азеотропную смесь воды и ксилола. Избыток ксилола упаривали в вакууме, к остатку прибавляли 50 мл сухого хлороформа и 6 мл (40 ммоль) метил-9-иоднонаноата (XIV) (полученного из 9-хлорнонаноновой кислоты так, как описано выше для метил-5-иодпентаноата) в 20 мл хлороформа, кипятили 5 ч, охлаждали, промывали 2 н.  $\text{HCl}$ , 5%  $\text{NaHCO}_3$ , водой и насыщенным  $\text{NaCl}$ , упаривали. Остаток перегоняли в вакууме, получали около 2 г (27%) альдегида (XV), индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.33 (Б, DNPН). Т. кип.  $125^\circ\text{C}/0.2$  кПа. 2,4-Динитрофенилгидразон альдегида (XV): т. пл.  $59 - 61^\circ\text{C}$ ; масс-спектр ( $m/z$ ): 366 ( $M^+$ ), 336 ( $[M - \text{NO}^+]$ ).

**(9Z)-13-Оксатетрадеценная кислота (XVI)** получена аналогично соединениям (VI) и (X). 0.93 г (2 ммоль) фосфониевой соли (XIII) действовали 370 мг  $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$  в 10 мл сухого  $\text{THF}$  превращали в соответствующий ирид, в результате реакции которого с 372 мг (2 ммоль) альдегида (XV) получали 127 мг (26%) (9Z)-метил-13-оксатетрадеценноата в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.56 (Б, РМА).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ , м. д.): 1.33 (8H, м, H4-H7), 1.66 (2H, м, H3), 2.05 (2H, м, H8), 2.31 (4H, м, H2 и H11), 3.34 (3H, с, H14), 3.39 (2H, т, H12), 3.70 (3H, с,  $\text{COOCH}_3$ ), 5.38 (1H, дт, H9,  $J_{8,9}$  7.5,  $J_{9,10}$  9.5 Гц),

5.48 (1H, дт, H10,  $J_{10,11}$  7.5,  $J_{9,10}$  9.5 Гц). Масс-спектр ( $m/z$ ): 243 ( $[M + \text{H}]^+$ ), 210 ( $[M - \text{MeOH}]^+$ ), 178 ( $[M - 2 \times \text{MeOH}]^+$ ). ИК (в хлороформе,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1755 (сл. эфир), 690 (C-H *cis*-алкена).

Из 100 мг (9Z)-метил-13-оксатетрадеценноата омылением получали 91 мг (95%) кислоты (XVI) в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.42 (А, РМА).

**14,14,14-Трифтор-12-оксатетрадекановая кислота (XVII)**. Реакцию проводили при перемешивании в атмосфере аргона. Натрий (0.30 г, 13 мг-атом) помещали в 30 мл  $\text{THF}$ , растворяли 5 мл (68 ммоль) трифторэтанола, по каплям добавляли 1.14 г (4.3 ммоль) 11-бромундекановой кислоты в 15 мл  $\text{THF}$  и кипятили 36 ч. После охлаждения из полученной желеобразной смеси растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в 100 мл этилацетата и экстрагировали водой ( $3 \times 30$  мл). Водный экстракт подкисляли 6 н.  $\text{HCl}$  до pH 1 и экстрагировали этилацетатом ( $3 \times 30$  мл), экстракт высушивали  $\text{MgSO}_4$ , остаток дважды хроматографировали на колонке с силикагелем в градиентных системах хлороформ-этилацетат (95 : 5)  $\rightarrow$  хлороформ-этилацетат-уксусная кислота (89 : 10 : 1) и гексан-диэтиловый эфир (4 : 1)  $\rightarrow$  гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (80 : 20 : 1), контролируя фракции ТСХ (А, РМА). Получали 0.56 г (46%) кислоты (XVII) в виде бесцветного аморфного вещества.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ , м. д.): 1.3 (м, 12H, H4-H9), 1.63 (м, 4H, H3 и H10), 2.37 (т, 2H, H2), 3.62 (т, 2H, H11), 3.83 (к, 2H, H13). Масс-спектр метилового эфира ( $m/z$ ): 298 ( $[M]^+$ ), 267 ( $[M - \text{OMe}]^+$ ), 199 ( $[M - \text{OCH}_2\text{CF}_3]^+$ ). Кислота (XVII) после превращения в *n*-бромфенациловый эфир индивидуальна по данным ВЭЖХ ( $k_1$  4.38); у производных 11-бромундекановой и 10-ундеценной кислот  $k_1$  6.75 и 5.75 соответственно.

**Определение анти-ВИЧ-активности аналогов миристиновой кислоты.** Клетки МТ4 в концентрации  $3 \times 10^5$  кл./мл инфицировали ВИЧ-1 (штамм RF<sup>2</sup>) с множественностью 0.03, отмывали от несвязавшегося вируса и помещали в 24-луночный планшет. В каждую лунку добавляли равный объем ростовой среды (RPMI 1640 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мМ глутамином и 40 мкг/мл гентамицина), содержащей испытуемое вещество. Конечная концентрация ингибиторов в среде составляла 100 мкМ. В контрольные лунки добавляли раствор миристиновой кислоты. На 3, 5 и 7-е сут культивирования отбирали пробы, в которых определяли концентрацию вирусного антигена р24 методом ELISA с использованием тест-системы НПО "Вектор" (Новосибирск).

С целью предварительного скрининга препаратов определяли титр вируса в культуральной жидкости после 5 сут инкубирования в присутствии соответствующих химиопрепаратов. Для этого готовили серии последовательных разведений культуральной жидкости, освобожденной от

целых клеток и клеточного дебриса, сокультивировали с равным объемом суспензии клеток МТ4 и на 4 - 5-е сут определяли конечное разведение инфекционного вируса по синцитиеобразованию.

Испытуемые вещества хранили в виде растворов в DMSO при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Конечная концентрация растворителя в культуральной среде не превышала 0.1%. Цитотоксическое действие ингибиторов на клетки определяли по подавлению включения  $[^3\text{H}]$ тимидина в клеточную ДНК. Эксперименты проводили 2 - 4 раза.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-03-09122).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gordon J.I., Duronio R.J., Rudnick D.A., Adams S.P., Gokel G.W. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 14. P. 8647 - 8650.
- Wilcox C., Hu J.-S., Olson E.N. // *Science*. 1987. V. 238. № 4831. P. 1275 - 1278.
- Towler D.A., Gordon J.I., Adams S.P., Glaser L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1988. V. 57. № 1. P. 69 - 90.
- Gottlinger H.G., Sodroski J.G., Haseltine W.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 15. P. 5781 - 5785.
- Rein A., McClure M.K., Rice N.R., Luftig R.B., Schultz A.M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. № 19. P. 7246 - 7250.
- Bryant M.L., Heuckeroth R.O., Kimata J.T., Ratner L., Gordon J.I. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 22. P. 8655 - 8659.
- Bryant M.L., Ratner L., Duronio R.J., Kishore N.S., Adams S.P., Gordon J.I. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. № 6. P. 2055 - 2059.
- Langner C.A., Lodge J.K., Travis S.J., Caldwell J.E., Lu T., Li Q., Bryant M.L., Devadas B., Gokel G.W., Kobayashi G.S., Gordon J.I. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 24. P. 17159 - 17169.
- Heuckeroth R.O., Gordon J.I. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 14. P. 5262 - 5266.
- Mumby S.M., Heuckeroth R.O., Gordon J.I., Gilman A.G. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. № 2. P. 728 - 732.
- Heuckeroth R.O., Glaser L., Gordon J.I. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 23. P. 8795 - 8799.
- Devadas B., Kishore N.S., Adams S.P., Gordon J.I. // *Biorgan. Med. Chem. Letters*. 1993. V. 3. № 4. P. 779 - 784.
- Pidgeon C., Markovich R.J., Lin M.D., Holzer T.J., Novak R.M., Keyer K.A. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 11. P. 7773 - 7778.
- Heuckeroth R.O., Jackson-Machelsky E., Adams S.P., Kishore N.S., Huhn M., Katoh A., Lu T., Gokel G.M., Gordon J.I. // *J. Lipid Res.* 1990. V. 31. № 6. P. 1121 - 1129.
- Kishore N.S., Lu T., Knoll L.J., Katoh A., Rudnick D.A., Mehta P.P., Devadas B., Huhn M., Atwood J.L., Adams S.P., Gokel G.W., Gordon J.I. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 14. P. 8835 - 8855.
- Corey E.J., Suggs J.W. // *Tetrahedron Lett.* 1975. V. 16. № 31. P. 2647.
- Bestmann H.J., Vostrowsky O. // *Chem. Phys. Lipids*. 1979. V. 24. № 4. P. 335 - 389.
- Wannagat U., Niederprum H. // *Chem. Ber.* 1961. V. 94. № 6. P. 1540 - 1547.
- Joyce R.M., Hanford W.E., Harmon J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1948. V. 70. № 7. P. 2529 - 2533.
- Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Stuttgart: Georg Thieme, 1958. B. 11/2. S. 192.
- Hoffman K., Yoko C.W. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1959. V. 81. № 13. P. 3356 - 3358.
- Бергельсон Л.Д., Молотковский Ю.Г., Шемякин М.М. // *Журн. общ. химии*. 1962. Т. 32. № 1. С. 58 - 64.
- Muller E., Rundel W. // *Angew. Chem.* 1958. V. 70. № 1. P. 105.
- Karvonen // *Chem. Zbl.* 1912. B. II. S. 1271.

## A New Oxaanalog of Myristic Acid that Suppresses the Replication of Human Immunodeficiency Virus

E. L. Vodovozova\*, I. I. Mikhalev\*, A. A. Rzhadinova\*\*,  
M. M. Garaev\*\*, and Yul. G. Molotkovsky\*

\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

\*\* Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

**Abstract** – A series of oxaanalogues of myristic acid were synthesized and tested for antiviral activity in МТ4 cells infected with human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). The synthesized acids have no toxic effect on uninfected МТ4 cells at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . 14,14,14-Trifluoro-12-oxatetradecanoic acid substantially (by 75%) inhibits the reproduction of HIV-1. Other compounds synthesized, (7Z)-13-, (9Z)-13-, and (7Z)-11-oxatetradecenoic acids, exhibit no antiviral effect.

**Key words:** inhibitors of retroviruses, anti-HIV agents, protein N-myristoylation, myristoyl-CoA: protein-N-myristoyltransferase, myristic acid oxaanalogues, inhibitors of virus-specific protein myristoylation.