



УДК 577.115.017:547.9:578.828.6

НОВЫЕ ФОСФОЛИПИДЫ – ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА. СИНТЕЗ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 1996 г. Е. Л. Водовозова, Ю. Б. Павлова, М. А. Полушкина, 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, Москва

Поступила в редакцию 27.12.95 г.

Синтезирован ряд новых фосфатидовых производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидезоксиинозина: с фосфатидатом и тионфосфатидатом диалкильного типа, с диацильным фосфатидатом, имеющим остатки 14,14,14-трифтор-12-оксатетрадекановой кислоты и природные ацильные остатки (как в яичном фосфатидилхолине). Кроме того, получены фосфатидовые (диацильного типа) производные глицирретиновой кислоты. Все синтезированные соединения имеют значительную анти-ВИЧ-активность. Наибольший интерес представляют производные глицирретиновой кислоты ввиду их малой токсичности и, предположительно, альтернативного в сравнении с антивирусными нуклеозидами механизма подавления репродукции ВИЧ.

Ключевые слова: ингибиторы ретровирусов, анти-ВИЧ-соединения, фосфатидилнуклеозиды; фосфатидилглицирретинат.

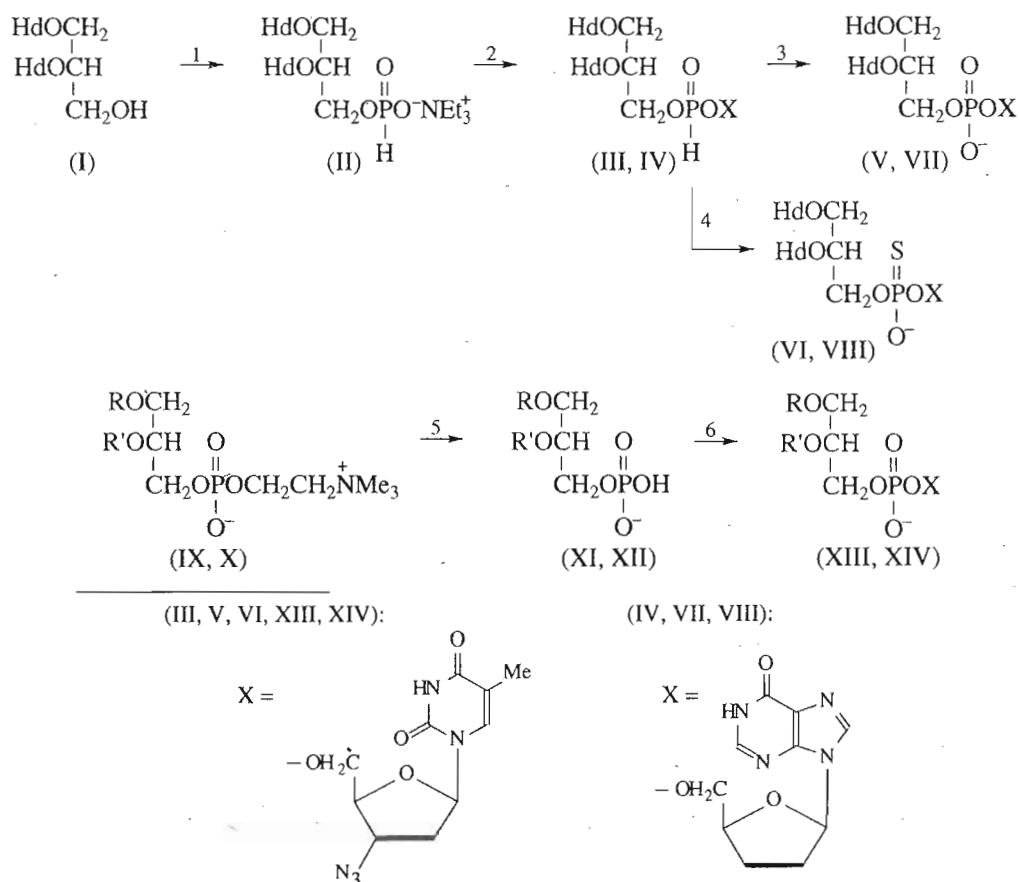
Среди применяемых сейчас в клинике лекарств против СПИДа центральное место занимают не природные аналоги нуклеозидов, которые по механизму своего действия являются ингибиторами обратной транскриптазы (RT) вируса: 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT), 2',3'-дидезоксиаденозин, 2',3'-дидезоксиинозин (ddI) и ряд других. Постоянно предлагаются новые соединения этого класса. Однако высокая изменчивость вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), приводящая к быстрому появлению устойчивых штаммов, постепенно делает эти соединения малоэффективными, кроме того, ингибиторы RT весьма токсичны. Для природных нуклеозидов один из путей уменьшения их токсичности – превращение в липофильные производные (ЛПНН), несущие, например, фосфатидовый [1, 2], диглицеродифосфорильный [1, 3], диглицеротрифосфорильный [4] или алкил(арил)-фосфорильный [5] остаток. Так как после превращения неприродного нуклеозида в ЛПНН механизм антивирусного действия остается тем же (активное начало – трифосфат нуклеозида [6, 7]),

уменьшение токсичности можно, вероятно, отнести на счет различий в фармакокинетике. Действительно, благодаря своей амфифильности ЛПНН приобретают новое качество – способность преодолевать клеточные мембраны и проникать во многие клетки, куда доступ для немодифицированных соединений затруднен [1]. По-видимому, этим объясняется тот факт, что фосфатидовые производные AZT и 2'-азидо-2',3'-дидезоксиуридина в отличие от исходных нуклеозидов при внутривенном введении мышам интенсивно накапливаются в лимфатических узлах [8]. Предполагается также, что ЛПНН способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, что важно для лекарств против СПИДа [9].

В предыдущей работе [10] мы описали синтез и свойства ряда оксааналогов миристиновой кислоты. Ранее Гордон и сотр. (см. [11] и работы, цитированные там) показали, что такие аналоги ингибируют репродукцию ВИЧ, нарушая функционирование миристоилированных белков вируса. Среди полученных нами соединений 14,14,14-трифтор-12-оксатетрадекановая кислота (Tft-OH) показала значительную анти-ВИЧ-активность [10]. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе и анти-ВИЧ-активности ряда новых фосфатидовых производных AZT и ddI (V–VIII, XIII, XIV), а также глицирретиновой кислоты (XV, XVI) (см. схемы 1 и 2).

Сокращения: ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1; ЛПНН – липофильные производные неприродных нуклеозидов; AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ddI – 2',3'-дидезоксиинозин; Hd – *n*-гексадецил; GA – глицирретиновая кислота; Ptd – фосфатидил; RT – обратная транскриптаза; Tft – 14,14,14-трифтор-12-оксатетрадеканол; TosCl – *n*-толуолсульфохлорид.

Автор для переписки.



(IX, XI, XIII): R, R' – жирнокислотные остатки, как в яичном фосфатидилхолине

(X, XII, XIV): R = R' = CF₃CH₂O(CH₂)₁₀CO–

Hd = n-C₁₆H₃₃–

1 – PCl₃/NEt₃; 2 – X–H/Me₃CCOCl; 3 – I₂/пиридин; 4 – S/толуол–пиридин; 5 – фосфолипаза D; 6 – X–H/TosCl

Схема 1.

Хотя известен целый набор фосфатидовых производных различных антивирусных нуклеозидов, влияние природы фосфатидового остатка на анти-ВИЧ-активность остается неизученным. Все до сих пор синтезированные соединения такого рода были диацилфосфатидатами с остатками лауриновой [13], миристиновой [1, 3], пальмитиновой [12], стеариновой [4] или пальмитиновой + олеиновой [2] кислот; зависимость антивирусной активности от природы ацильных цепей не рассматривалась. Но такую зависимость можно предположить: прежде всего, от характера фосфатидовой части молекулы должна зависеть способность последней встраиваться в плазматическую мембрану и, следовательно, проникать в клетку. Кроме того, считается, что фосфатидилнуклеозиды в клетке гидролизуются эндогенными фосфолипазами и фосфатазами, образуя свободные антивирусные нуклеозиды и (или) их фосфаты [1], на специфичность действия этих ферментов строение фосфатидовой части влияет непосредственно.

Исходя из этих соображений, мы синтезировали и испытали анти-ВИЧ-активность *in vitro* нескольких новых фосфатидовых производных AZT и ddI. Это фосфатиды (V) и (VII), содержащие ди(гексадецил)глицериновый остаток вместо природного диацилглицеринового, а также их тиофосфатные аналоги (VI) и (VIII). Кроме того, получены два диацильных фосфатидовых производных AZT. Фосфатид (XIII) с диглицеридной частью природного строения, как в яичном фосфатидилхолине, будучи очень близким ранее описанным соединениям – с димиристоилглицериновым остатком [1] и 1-пальмитоил-2-олеоилглицериновым [2], – должен был служить “связующим звеном”, позволяющим соотносить данные по активности полученных нами веществ с литературными данными. Мы получили также Tft-производное (XIV), предполагая, что включение в состав молекулы остатков кислоты, имеющей собственную антивирусную активность [10], может привести к синергическому эффекту: Пиджен и сотр. [14] сообщают, что включение оксааналога миристиновой

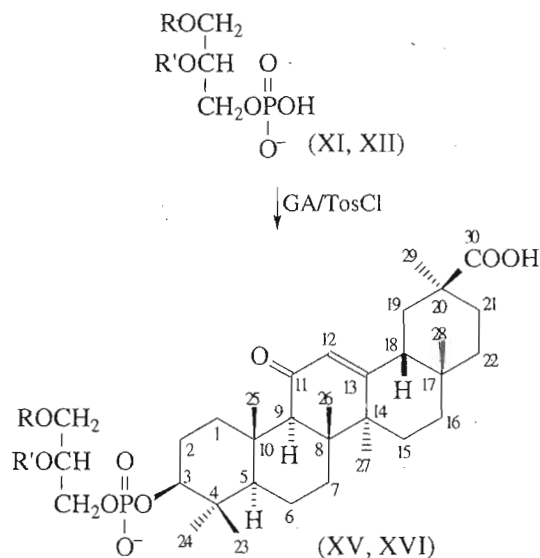
кислоты в состав фосфатидилэтаноламина привело к соединению, имеющему анти-ВИЧ-активность, в 40 раз большую, чем исходная кислота.

Кроме фосфатидатов нуклеозидов мы получили также фосфатидовые производные (XV) и (XVI) глицирретиновой кислоты (GA). Для глицирризина (диглюкуронид GA, ингредиент лакричного корня) небольшая анти-ВИЧ-активность была показана двумя группами исследователей [14–16]; попытки увеличить ее путем модифицирования глицирретинового остатка не дали желаемых результатов – 85% подавление репликации ВИЧ *in vitro* глицирризином или его наиболее активным синтетическим аналогом достигается при концентрации 160 мкМ [15]. Эти же опыты показали, что неперемное условие для проявления анти-ВИЧ-активности – присутствие карбоксильной группы в положении 20 глицирретинового остатка [15]. Весьма важно то, что глицирризин подавляет репродукцию ВИЧ не только в Т-клетках, но и в моноцитах [16].

Известно также, что глицирризин ингибирует *in vitro* репродукцию вирусов герпеса, везикулярного стоматита и некоторых других (см. литературу, цитированную в [15]). Наш интерес к производным GA был вызван еще их низкой токсичностью (лакричный корень употребляется в кондитерских изделиях) и альтернативностью действия по сравнению с антивирусными нуклеозидами.

Механизм подавления репликации ВИЧ глицирризином неизвестен, однако установлено, что ингибирования RT при этом нет [15]. Известно, что производное другого тритерпеноида, бетулиновой кислоты, имеющей сходную с GA структуру, ингибирует репродукцию ВИЧ-1 [17]. Де Клерк считает, что это производное, связываясь с поверхностным гликопротеином ВИЧ (gp120 или gp41), блокирует связывание вируса с клеткой [6]. Эти данные побудили нас получить производные GA, имеющие повышенное сродство к мембране. Мы провели модифицирование GA фосфатидовым остатком, имея при этом также в виду, что последний сам должен приносить некоторую анти-ВИЧ-активность: по данным Виллера и др. [18], такую активность имеют липосомы из наиболее распространенного фосфолипида – фосфатидилхолина.

Фосфатидилнуклеозиды диалкильного типа (V)–(VIII) мы синтезировали с помощью H-фосфонатного метода [19]: 1,2-дигексадецил-*sn*-глицерин (I) реакцией с треххлористым фосфором был превращен в H-фосфонат (II), который при конденсации с AZT или ddI в присутствии пивалоилхлорида образовал фосфитдиэфиры (III) и (IV). Эти эфиры были окислены действием иода в пиридине в фосфатидил-AZT (V) и фосфатидил-ddI (VII). В результате реакции фосфитдиэфиров (III),



(XV): R, R' – жирнокислотные остатки, как в яичном фосфатидилхолине
 (XVI): R = R' = CF₃CH₂O(CH₂)₁₀CO–

Схема 2.

(IV) с серой в смеси толуол–пиридин были получены соответствующие тионфосфаты (VI), (VIII).

Фосфатидаты AZT диацильного типа (XIII), (XIV) мы синтезировали по “классическому” пути. Фосфатидилхолина, яичный (IX) и с Tft-остатками (X) (последний был получен ацилированием CdCl₂-комплекса *sn*-глицеро-3-фосфохолина действием Tft-OH в присутствии DCC и 4-пирролидинопиридина), были превращены в соответствующие фосфатидовые кислоты (XI), (XII) ферментолитом фосфолипазой D. Конденсация фосфатидовых кислот с AZT в присутствии *n*-толуолсульфохлорида привела к диацильным фосфатидам (XIII) и (XIV) (схема 1). Триизопропилбензолсульфохлорид, чаще применяемый в подобных случаях как конденсирующий агент, не давал увеличения выхода, но усложнял выделение продукта реакции.

Производные глицирретиновой кислоты (XV), (XVI) были синтезированы аналогичным образом – конденсацией GA с фосфатидовыми кислотами (XI), (XII) в присутствии TosCl (схема 2). Выход фосфатидатов (XV), (XVI) оказался невысоким (10–40%), очевидно, потому, что карбоксильную функцию GA, предполагая ее невысокую реакционную способность из-за малой стерической доступности, мы оставили незащищенной; видимо, этот синтез требует усовершенствования.

Мы провели исследование ингибирования репродукции ВИЧ-1 синтезированными веществами *in vitro* (табл. 1), а также, для части AZT-производных (XIII), (V), (VI) и глицирретинатов (XV), (XVI), – токсичности на неинфицированных клетках (табл. 2). Данные по фосфатидовым производным

Таблица 1. Ингибирование репродукции ВИЧ-1 фосфатидилнуклеозидами и фосфатидилглицерретинатами в клетках СЕМ SS

Соединение	Ингибирование (%) при концентрации вещества, мкМ		
	10	1	0.1
AZT	99	85	70
(XIII): Ptd-AZT, диацил-	96	86	67
(XIV): Ptd-AZT, ди-Tft-	99	70	40
(V): Ptd-AZT, диалкил-	96	48	26
(VI): Ptd-AZT, диалкил-, тион	92	68	13
ddI	82	50	20
(VII): Ptd-ddI, диалкил-	80	25	5
(VIII): Ptd-ddI, диалкил-, тион	67	20	5
Глицерретиновая кислота	10	7	3
(XV): Ptd-GA, диацил-	85	40	29
(XVI): Ptd-GA, ди-Tft-	77	45	25

Таблица 2. Токсичность фосфатидовых производных AZT на неинфицированных клетках СЕМ SS (стандартный тест с трипановым синим)*

Соединение	Жизнеспособные клетки (%) при концентрации вещества, мкМ		
	10	1	0.1
AZT	33	70	87
(XIII): Ptd-AZT, диацил-	43	86	97
(V): Ptd-AZT, диалкил-	65	90	98
(VI): Ptd-AZT, диалкил-, тион	31	74	74

* Глицерретиновые производные (XV), (XVI) не обнаружили токсичности при концентрации 20 мкМ.

нуклеозидов диалкильного (V, VII) и диацильного (XIII, XIV) типов показывают, что все они имеют значительную анти-ВИЧ-активность, несколько уступающую активности исходных AZT и ddI; соответственно ниже и токсичность; это вполне согласуется с данными по активности и токсичности других фосфатидовых производных нуклеозидов [3]. По-видимому, те и другие гидролизуются в клетках фосфолипазами (фосфолипазами) [1], образуя соответствующие фосфаты нуклеозидов и(или) сами нуклеозиды, причем фосфатиды диалкильного (V–VIII) типа расщепляются, видимо, несколько медленнее диацильных (XIII, XIV). Можно предположить, что расщепление фосфатидатов производится в основном фосфоэстеразами с активностью фосфолипаз C и D, но не фосфолипазой A и затем фосфатазой (Хостетлер и др. [1] предполагают обе возможности): алкильные фосфолипиды не могут быть субстратами фосфолипазы A, но расщепляются фосфолипазами C и D [20, 21]. Диалкильные тионовые фосфатиды (VI), (VII) еще менее активны по сравнению с P=O-производными (V), (VII); кроме того, у тионового

AZT-фосфатида (VI) отмечена повышенная токсичность (табл. 1 и 2). Это может быть результатом уменьшения селективности сродства P=S-производного AZT к вирусной RT сравнительно с клеточными ДНК-полимеразами; как известно, именно такая селективность обуславливает возможность лекарственного применения ингибиторов RT [6, 22].

Не оправдалось и наше предположение о возможности большей анти-ВИЧ-активности фосфатидил-AZT с Tft-остатками (XIV) – это вещество не имело преимуществ перед аналогом (XIII) с природными жирнокислотными остатками (табл. 1); фосфатидилхолин (X) с Tft-остатками был неактивен при концентрации 10 мкМ (данные не приведены). Суммируя результаты испытаний нуклеозидных аналогов, можно сказать, что они не принесли неожиданностей. Однако следует иметь в виду, что поведение лекарственных веществ *in vitro* может сильно отличаться от поведения *in vivo*. Штейм и др. [2] в опытах *in vivo* нашли, что в кровотоке фосфатидовые производные нуклеозидов легко встраиваются в липопротеины. В этих условиях синтезированные нами диалкильные производные (V)–(VIII), будучи устойчивыми к действию липопротеиновых ферментов (липазы и лецитин: холестеринацилтрансферазы), должны иметь существенное преимущество перед диацильными. Те же Штейм и сотр. [2] проводят такую параллель: фосфатидовое производное противоопухолевого агента araC имеет *in vitro* меньшую активность, чем сам araC, но *in vivo* – гораздо большую.

Наиболее интересными нам представляются результаты испытаний глицерретиновых производных (XV), (XVI). Оба вещества имеют близкую и весьма существенную анти-ВИЧ-активность (табл. 1), намного превосходящую активность самой GA, близкую, насколько можно судить, активности глицерризина [14–16]. Как и следовало ожидать, эти производные малотоксичны. Весьма вероятно, что механизм ингибирования ими репликации ВИЧ тот же, что и у родственного глицерризина: они, предположительно, препятствуют связыванию и(или) слиянию вируса с плазматической мембраной (см. выше). Последнее очень важно, если учесть, что слияние ВИЧ с плазматической мембраной осуществляется, как полагают, с помощью одного из участков вирусного белка gp41 [23] и последовательность этого участка весьма консервативна [24] в противоположность чрезвычайной изменчивости RT, приводящей к возникновению устойчивых к ингибиторам RT штаммов. Кроме того, есть данные, что механизм слияния с клеточной мембраной и последовательность “пептида слияния” подобны и у других вирусов, например вируса гриппа [23]. Все изложенное выше, а также доступность фосфатидатов GA говорит о том, что полученные нами вещества, а также их аналоги заслуживают дальнейшего серьезного исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезах использовали 1,2-дигексадецил-*sn*-глицерин, глицирретиную кислоту (GA), N,N'-дихлорогексилкарбодиимид, 4-пирролидинопиридин, триэтиламин и фосфотрихлорид (Fluka, Швейцария); пивалоилхлорид и сухой пиридин (Merck, Германия); остальные реактивы и растворители – фирмы "Реахим" (Россия); AZT и ddI синтезированы в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН. 14,14,14-Трифтор-12-оксатетрадекановую кислоту [10], *sn*-глицеро-3-фосфохолин (комплекс с CdCl₂) [25, с. 236–238] и фосфатидовую кислоту из яичного фосфатидилхолина (*M_r* ~ 680) [25, с. 170–171] получали как описано ранее. Сухой эфир получали перегонкой над алюмогидридом лития, сухие CH₂Cl₂ и хлороформ – перегонкой над P₂O₅. Все выпаривания проводили в вакууме при температуре не выше 40°C.

Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–63 мкм, Merck), сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция) и окись алюминия ("Реахим"), для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 100 : 20 : 1 (А) и 65 : 25 : 4 (Б); обнаружение с помощью фосфорномолибденовой кислоты (а), молибденового синего [26] (б) и УФ-облучения (в).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре LKB Ultraspec II (Швеция) в этаноле. Спектры ¹H- и ³¹P-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker WM 500 в смеси C²HCl₃–C²H₃O²N, 2 : 1 (где не указано особо); химические сдвиги приведены в миллионных долях. Масс-спектры (FAB) получали на приборе Kratos MS-50TC (Англия), энергия атомов ксенона 8 эВ, матрица – глицерин.

1,2-Дигексадецил-*sn*-глицеро-3-Н-фосфонат (II), триэтиламмониевая соль. К раствору 0,44 г (6,5 ммоль) имидазола в 4 мл CH₂Cl₂ при 0°C по каплям прибавляли раствор 0,14 мл (1,6 ммоль) фосфотрихлорида в 1,5 мл CH₂Cl₂, затем 0,5 мл триэтиламина в 1,5 мл CH₂Cl₂, перемешивали 15 мин, охлаждали до –10°C и за 40 мин прибавляли раствор 0,26 г (0,48 ммоль) 1,2-дигексадецил-*sn*-глицерина (I) в 8 мл CH₂Cl₂, после чего температуру постепенно повышали до комнатной. Через 1 ч к смеси прибавляли 5 мл воды, перемешивали 15 мин, разбавляли 100 мл смеси хлороформ–триэтиламин, 97 : 3, промывали водой (2 × 50 мл), высушивали Na₂SO₄. Из остатка хроматографией (элюирование смесью хлороформ–метанол–триэтиламин, 92 : 4 : 4) выделяли 0,28 г (83%) аморфной соли фосфоната (II), *R_f* 0,30 в системе хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 100 : 15 : 1 (обнаружение: а, б). ³¹P-ЯМР: 5,27 (д, ¹J_{PH} 630 Гц); масс-спектр, *m/z*: 604 (*M*⁺ + Н).

3'-Азидо-3'-дезоксидеокси-5'-(1,2-дигексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфо)тимидин (V). К раствору 60 мг (85 ммоль) фосфоната (II) в 0,5 мл сухого пири-

дина при перемешивании в атмосфере аргона прибавляли 60 мг (0,22 ммоль) AZT и 25 мкл (0,20 ммоль) пивалоилхлорида. Через 20 мин к смеси прибавляли 0,2 мл 2% раствора иода в смеси пиридин–вода, 98 : 2, перемешивали 20 мин и прибавляли 4 мл воды и 20 мл хлороформа. Органический слой промывали 5% водным NaHSO₃ и дважды водой (по 20 мл), после высушивания (Na₂SO₄) и упаривания хроматографией на силикагеле (элюирование системой А) выделяли 40 мг (54%) фосфодиэфира (V). ТСХ: *R_f* 0,40 (А; б, в); УФ: λ_{макс} 264 нм (lgε 3,8); ³¹P-ЯМР: 0,88 (с); масс-спектр, *m/z*: 870 (*M*⁺ + Н), 844 (*M*⁺ – N₂ + 2Н).

3'-Азидо-3'-дезоксидеокси-5'-(1,2-дигексадецил-*sn*-глицеро-3-тионфосфо)тимидин (VI). К раствору 100 мг (0,14 ммоль) фосфоната (II) в 0,5 мл сухого пиридина при перемешивании в атмосфере аргона прибавляли 100 мг (0,37 ммоль) AZT и 40 мкл (0,33 ммоль) пивалоилхлорида. Через 20 мин к смеси прибавляли 1,5 мл 6% суспензии серы в смеси толуол–пиридин, 1 : 1, и после 12 ч перемешивания прибавляли 8 мл воды и 25 мл хлороформа. Органический слой промывали водой (2 × 20 мл), высушивали (Na₂SO₄) и упаривали; хроматографией (элюирование системой хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 100 : 10 : 1) выделяли 84 мг (69%) фосфодиэфира (VI). ТСХ: *R_f* 0,46 (А; б, в); УФ: λ_{макс} 264 нм (lgε 3,7); ³¹P-ЯМР (в C²HCl₃): 59,09 (с); масс-спектр, *m/z*: 886 (*M*⁺ + 2Н), 860 (*M*⁺ – N₂ + 2Н).

2',3'-Дидезокси-5'-(1,2-дигексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфо)инозин (VII) получали аналогично фосфатидату (V) из 90 мг (0,13 ммоль) фосфоната (II) и 90 мг (0,38 ммоль) ddI; выход 50 мг (43%). Аморфное вещество; ТСХ: *R_f* 0,18 (А; б, в); УФ: λ_{макс} 248 нм (lgε 4,0); ³¹P-ЯМР (в C²HCl₃): 0,15 (с); масс-спектр, *m/z*: 839 (*M*⁺ + Н), 703 [*M*⁺ – C₅H₃N₄O (гипоксантин)].

2',3'-Дидезокси-5'-(1,2-дигексадецил-*sn*-глицеро-3-тионфосфо)инозин (VIII) синтезирован аналогично фосфатидату (VI) из 28 мг (40 ммоль) фосфоната (II) и 28 мг (0,12 ммоль) ddI; выход 23 мг (69%). Аморфное вещество; ТСХ: *R_f* 0,36 (А; б, в); УФ: λ_{макс} 248 нм (lgε 4,1); ³¹P-ЯМР (в C²HCl₃): 58,55 (с); масс-спектр, *m/z*: 855 (*M*⁺ + Н), 719 [*M*⁺ – C₅H₃N₄O (гипоксантин)].

1,2-Ди(14,14,14-трифтор-12-оксатетрадеканоил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (X) синтезировали по модифицированному методу [27]; реакционную колбу и реагенты тщательно высушивали. К суспензии CdCl₂-комплекса *sn*-глицеро-3-фосфохолина (0,64 г, 1,45 ммоль) в 6 мл сухого хлороформа прибавляли в атмосфере аргона 0,54 г (3,56 ммоль) 4-пирролидинопиридина, 1,0 г (3,3 ммоль) Tft-OH и затем при перемешивании раствор 2 г (~10 ммоль) N,N'-дихлорогексилкарбодиимида в 5 мл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали 20 ч при

20°C, разбавляли 50 мл хлороформа, промывали 1% HCl, дважды 5% NaCl и насыщ. NaCl (по 10 мл), высушивали Na₂SO₄. Остаток хроматографировали на окиси алюминия (активность III), элюируя хлороформом с 10–20% метанола, контроль ТСХ в системе Б (б). Получали 0.90 г (78%) фосфатидилхолина (X) в виде аморфной массы. ТСХ: R_f 0.30 (Б; а, б); масс-спектр, m/z: 790 (M⁺).

1,2-Ди(14,14,14-трифтор-12-оксатетрадеканонил)-sn-глицеро-3-фосфат (XII) был получен из фосфатидилхолина (X) ферментоллизом фосфолипазой D, как описано для синтеза фосфатидата (XI) из яичного фосфатидилхолина (IX) [25, с. 170–171]. Из 220 мг фосфатида (X) получали 154 мг (~70%) аморфного фосфатидата (XII) (катионный состав не определяли; предположительно K⁺/Na⁺/NH₄⁺). ТСХ: R_f 0.31 (хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 65 : 35 : 8; а, б); ¹H-ЯМР (в C²HCl₃): протоны Tft: 1.20–1.43 (м, 24Н, Н4–Н9), 1.61 (м, 8Н, Н3 и Н10), 2.32 (м, 4Н, Н2), 3.61 (т, 4Н, Н11), 3.82 (к, 4Н, Н13, ³J_{F,H} 10 Гц); протоны глицерина (ср. [28]): 4.0 (м, 2Н, Н3), 4.20, 4.39 (слабо разр. дд, 2Н, Н1), 5.26 (м, 1Н, Н2); масс-спектр, m/z: 706 (M⁺ + Н), 607 (M⁺ – H₂PO₄).

3'-Азидо-3'-дезоксидеокси-5'-(1,2-ди(14,14,14-трифтор-12-оксатетрадеканонил)-sn-глицеро-3-фосфо)тимидин (XIV). Смесь 8 мг (11 мкмоль) фосфатидата (XII) и 6 мг (22 мкмоль) AZT высушивали упариванием с пиридином (2 × 3 мл), растворяли в 300 мкл сухого пиридина, прибавляли 10.5 мг (55 мкмоль) TosCl и выдерживали 20 мин при 70°C. К охлажденной смеси прибавляли 30 мкл воды, перемешивали 30 мин и упаривали с толуолом (2 × 5 мл). Остаток растворяли в 5 мл хлороформа, промывали водой (2 × 1 мл), упаривали с толуолом. Остаток растворяли в 1 мл смеси хлороформ–метанол, 1 : 1, и фильтровали через колонку с сефадексом LH-20 (1 × 70 см) в том же растворителе, получали 4.1 мг (40%) аморфного фосфатидата (XIV). ТСХ: R_f 0.60 (Б; б, в); УФ: λ_{макс} 266 нм (lgε 3.97); ¹H-ЯМР: протоны Tft: 1.20–1.43 (м, 24Н, Н4–Н9), 1.68 (м, 8Н, Н3 и Н10), 2.40 (4Н, Н2), 3.70 (т, 4Н, Н11), 3.91 (к, 4Н, Н13, ³J_{F,H} 9.5 Гц); протоны глицерина: 5.31 (м, 1Н, Н2); нуклеозидные протоны: 2.04 (с, 3Н, 5-CH₃), 6.31 (т, 1Н, Н1'), 7.71 (с, 1Н, Н6); масс-спектр, m/z: 992 (M⁺ + К), 607 (M⁺ – AZT – HPO₄).

3'-Азидо-3'-дезоксидеокси-5'-(1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфо)тимидин (XIII). Синтезирован аналогично фосфатидату (XIV) из 35 мг (~50 мкмоль) фосфатидовой кислоты (IX) и 27 мг (0.1 ммоль) AZT; выход 9.8 мг (~23%). ТСХ: R_f 0.60 (Б; а–в) (одинаковая подвижность с фосфатидатом (XIV)); УФ: λ_{макс} 266 нм (lgε 4.0); ¹H-ЯМР: протоны ацилов: 0.98 (м, ~6Н, CH₃), 1.20–1.50 (шир. м, 32–34Н, CH₂), 1.69 (м, 4Н, Н3), 2.41 (м, 4Н, Н2), 5.41 (м,

~1Н, CH=С); протоны глицерина: 5.30 (м, 1Н, Н2); протоны нуклеозида: 2.07 (с, 3Н, 5-CH₃), 6.30 (т, 1Н, Н1'), 7.70 (с, 1Н, Н6).

3β-[1,2-Ди(14,14,14-трифтор-12-оксатетрадеканонил)-sn-глицеро-3-фосфо]глицирретиновая кислота (XVI). Смесь 10 мг (14 мкмоль) фосфатидовой кислоты (XII) и 13 мг (28 мкмоль) GA высушивали упариванием с сухим пиридином (2 × 3 мл; в атмосфере аргона), суспендировали в 0.3 мл пиридина, прибавляли 13 мг (70 мкмоль) TosCl и выдерживали 20 мин при 70°C. Далее смесь обрабатывали и подвергали гель-фильтрации, как описано для фосфатидил-AZT (XIV), полученное вещество (9 мг) хроматографировали на 0.8 г силикагеля в градиентной системе хлороформ против смеси хлороформ–метанол–вода, 40 : 8 : 1; получали 7 мг (~43%) аморфного фосфатида (XVI). ТСХ: R_f 0.30 (Б; а, б); УФ: λ_{макс} 249 нм (lgε 4.18); ¹H-ЯМР: протоны GA-остатка: 0.96, 1.16, 1.31, 1.32, 1.34, 1.40, 1.53 (7с, 7 × 3Н, 7CH₃), 2.51 (с, 1Н, Н9), 5.82 (с, 1Н, Н12); область Tft: 1.44 (м, 24Н, Н4–Н9), 1.74 (м, 8Н, Н3 и Н10), 2.45 (4Н, Н2), 3.75, 3.77 (т, 4Н, Н11), 3.95 (к, 4Н, Н13); протоны глицерина: 4.11 (м, 2Н, Н3), 4.51 (слабо разр. дд, 1Н, один из Н1), 5.36 (м, 1Н, Н2); масс-спектр, m/z: 1195 (M⁺ + К), 1157 (M⁺ + Н).

3β-(1,2-Диацил-sn-глицеро-3-фосфо)глицирретиновая кислота (XV) синтезирована аналогично глицирретинату (XVI) из 49 мг (~73 мкмоль) фосфатидовой кислоты (XI) и 70 мг (0.15 ммоль) GA; получали 8 мг (~10%) аморфного фосфатида (XVI). ТСХ: R_f 0.35 (Б; а, б); УФ: λ_{макс} 250 нм (lgε 4.12); ¹H-ЯМР: протоны GA-остатка: 0.99, 1.20, 1.30, 1.31, 1.34, 1.53 (6с, 6 × 3Н, 6CH₃), 2.57 (с, 1Н, Н9), 5.80 (с, 1Н, Н12); протоны ацилов: 1.02–1.10 (м, ~6Н, CH₃), 1.35–1.55 (шир. м, 34–37Н, CH₂ ацилов и один CH₃ GA), 1.74–1.82 (м, 4Н, Н3), 2.45–2.50 (м, 4Н, Н2).

Анти-ВИЧ-активность испытуемых препаратов определяли по образованию синцитиев при совместной культивации инфицированных (с множественностью 0.03) и незараженных клеток СЕМ SS. Адсорбцию вируса проводили 2 ч при 37°C. Инфицированные клетки отмывали от несвязавшегося вируса и инкубировали 3 сут в атмосфере 5% CO₂ в присутствии исследуемых соединений, которые добавляли в виде 1% раствора в диметилсульфоксиде; концентрация растворителя в среде не превышала 0.1%. На 3–4-е сут после заражения 10⁵ инфицированных клеток сокультивировали с равным количеством чистых клеток СЕМ SS в 24-луночном планшете в объеме 1 мл. Через 24 ч после сокультивации проводили подсчет синцитиев (в каждой лунке учитывали 4 поля зрения). Степень ингибирования (%) синцитиеобразования испытуемыми препаратами рассчитывали относительно инфицированного контроля.

Авторы выражают благодарность А.И. Мирошникову и К.А. Антонову (ИБХ РАН), предоставившим AZT и ddI для этой работы.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 95-03-09122).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lzenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 6112–6117.
2. Steim J.M., Neto C.C., Sarin P.S., Sun D.K., Sehgal R.K., Turcotte J.G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 171. P. 451–457.
3. Hostetler K.Y., Richman D.D., Carson D.A., Stuhmiller L.M., van Wijk G.M.T., van den Bosch H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992. V. 36. P. 2025–2029.
4. Van Wijk G.M.T., Hostetler K.Y., Kroneman E., Richman D.D., Sridhar C.N., Kumar R., van den Bosch H. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. V. 70. P. 213–222.
5. McGuigan C., Pathirana R.N., Mahmood N., Devine K.G., Hay A.J. // *Antivir. Res.* 1992. V. 17. P. 311–321.
6. De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 2491–2517.
7. Mohan P. // *Pharmaceut. Res.* 1992. V. 9. P. 703–714.
8. Manoilov K.K., Fedorov I.I., Boudinot F.D., White C.A., Kotra L.P., Schinazi R.F., Hong C.I., Chu C.K. // *Antiviral Chem. Chemother.* 1995. V. 6. P. 230–238.
9. Sarin P.S., Goldstein A.L. // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1995. V. 17. P. 217–245.
10. Водовозова Е.Л., Михалев И.И., Ржанинова А.А., Гараев М.М., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 724–730.
11. 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. P. 17159–17169.
12. Van Wijk G.M.T., Hostetler K.Y., van den Bosch H. // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 1211–1219.
13. Pidgeon C., Markovich R.J., Liu M.D., Holzer T.J., Novak R.M., Keyer K.A. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 7773–7778.
14. Ito M., Nakajima H., Baba M., Pauwels R., De Clercq E., Shigeta S., Yamamoto N. // *Antiviral Res.* 1987. V. 7. P. 127–137.
15. Hirabayashi K., Iwata S., Matsumoto H., Mori T., Shibata S., Baba M., Ito M., Shigeta S., Nakashima H., Yamamoto N. // *Chem. Pharm. Bull.* 1991. V. 39. P. 112–115.
16. Пясунова О.А., Егоричева И.Н., Федюк Н.В., Покровский А.Г., Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Толстиков Г.А. // *Вопр. вирусол.* 1992. С. 235–238.
17. Mayaux J.F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Hénin Y., Dereu N., Evers M., Soler F., Poujade C., De Clercq E., Le Peck J.-B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 3564–3568.
18. Willer A., Heinzmann U., Mellert W., Kleinschmidt A., Goebel F.-D., Erfle V. // *Res. Exp. Med.* 1993. V. 193. P. 123–135.
19. Lindh I., Stawinski J. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 1338–1342.
20. Bugant M., Kuksis A., Myher J.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 235. P. 304–314.
21. Huang C.F., Wykle R.L., Daniel L.W. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 213. P. 950–957.
22. De Clercq E. // *Med. Res. Rev.* 1993. V. 13. P. 229–258.
23. Matthews T.J., Wild C., Chen C.-h., Bolognesi D.P., Greenberg M.L. // *Immunol. Rev.* 1994. P. 93–104.
24. Moore J.P., McKeating J.A., Weiss R., Sattentau Q. // *Science.* 1990. V. 250. P. 1139–1142.
25. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Батраков С.Г., Барсуков Л.И., Проказова Н.В. *Препаративная биохимия липидов.* М.: Наука, 1981. 256 с.
26. Vaskovsky V.E., Kostetsky V.Y., Vasendin I.M. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. P. 129–141.
27. Mena P.L., Djerassi C. // *Chem. Phys. Lipids.* 1985. V. 37. P. 257–270.
28. Lammers J.G., Liefkens Th.J., Bus J., van der Meer J. // *Chem. Phys. Lipids.* 1978. V. 22. P. 293–305.

Novel Phospholipid Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Replication: Synthesis and Antiviral Activity

E. L. Vodovozova*, Yu. B. Pavlova*, M. A. Polushkina*, A. A. Rzhaniнова**, M. M. Garaev**, and Ju. G. Molotkovsky*¹

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

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

Abstract—Several novel phosphatidic acid derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine were synthesized, which contained dialkylphosphatidyl, dialkylthiophosphatidyl moieties, as well as diacylphosphatidyl moiety with either 14,14,14-trifluoro-12-oxatetradecanoyl or natural acyl residues inherent in egg yolk phosphatidylcholine. Diacylphosphatidyl derivatives of glycyrrhetic acid were also prepared. All the synthesized compounds exhibited significant anti-HIV activity. The glycyrrhetic acid derivatives are of special interest because of their low toxicity and a supposedly different mechanism of action.

Key words: retrovirus inhibitors, anti-HIV compounds, phosphatidyl nucleosides, phosphatidylglycyrrhetic acid.

¹ To whom correspondence should be addressed.