



УДК 547.426.2+547.952+577.115.97+578.828.6

НОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ НУКЛЕОЗИДОВ С ФОСФОЛИПИДАМИ. СИНТЕЗ И АНТИ-ВИЧ-АКТИВНОСТЬ *rac*-1-ГЕКСАДЕЦИЛ-2-АЦИЛ-*sn*-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФОНУКЛЕОЗИДОВ

© 1997 г. С. И. Малекин, Ю. Л. Кругляк[#], Н. Ю. Хромова,
М. Ю. Аксенова, В. П. Соколов, А. В. Кисин, Т. И. Новожилова,
С. Г. Попова, В. К. Курочкин, Г. Г. Миллер*, Л. Н. Покидышева*

Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии,
111024, Москва, шоссе Энтузиастов, 23;

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Поступила в редакцию 25.12.96 г. Принята к печати 03.02.97 г.

Исходя из 1,2-дизамещенных глицеридов и нуклеозидов синтезированы новые конъюгаты нуклеозидов с фосфолипидами, в которых фосфолипидный компонент представлен *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоил- (или 2-метилкарбамоил)-*sn*-глицеро-3-фосфатом, а нуклеозидный – 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидином, 1-(*cis*-5-гидроксипентен-2-ил)тимидином или 2',3'-изопропилиденуридином. Указанные конъюгаты получены тремя путями: из *rac*-1-гексадецил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфодихлоридов, -3-фосфатов или -3-Н-фосфонатов. Конъюгаты, содержащие 2-пальмитоильную группу, при мягком щелочном алкохолизе образуют ранее не описанные конъюгаты с лизофосфолипидным фрагментом. Все полученные конъюгаты – аморфные соединения, устойчивые при комнатной температуре. Определены их гемолитическая и анти-ВИЧ-активность. Выявлено, что некоторые конъюгаты *in vitro* полностью подавляют репродукцию ВИЧ-1 в меньших дозах, чем соответствующие нуклеозиды.

Ключевые слова: фосфолипид, 1-алкил-2-ацилглицерин, глицерофосфат, нуклеозид, гемолиз, анти-ВИЧ-активность.

В последние годы при поиске лекарственных средств против СПИДа большое внимание уделяется изучению конъюгатов состава 1,2-дизамещенный глицерофосфат – биологически активный нуклеозид, в которых оба компонента молекулы объединены фосфоэфирной связью. Полагают, что конъюгаты этого типа благодаря наличию фосфолипидного остатка, обладающего повышенным сродством к биологическим мембранам, способны проникать внутрь инфицированных клеток, где после гидролиза внутриклеточными ферментами отщепляют свободный нуклеозид, выполняющий присущую ему роль антивирусного агента. Исходя из этих соображений были синтезированы и испытаны сначала 1,2-диацил-, а затем и 1,2-диалкил-*sn*-глицеро-3-фосфонуклеозиды [1–4]. Было показано, что конъюгаты имеют высокую антивирусную активность,

сопоставимую с активностью нуклеозидов, входящих в их состав. При этом конъюгаты обладают меньшей цитотоксичностью, чем соответствующие нуклеозиды.

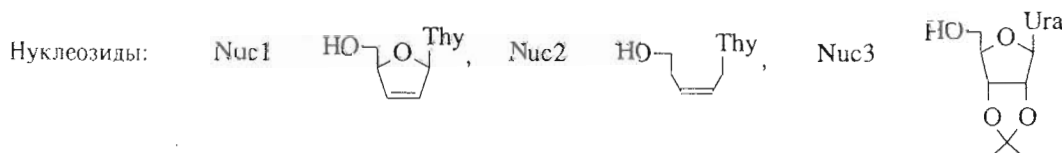
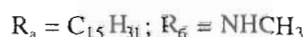
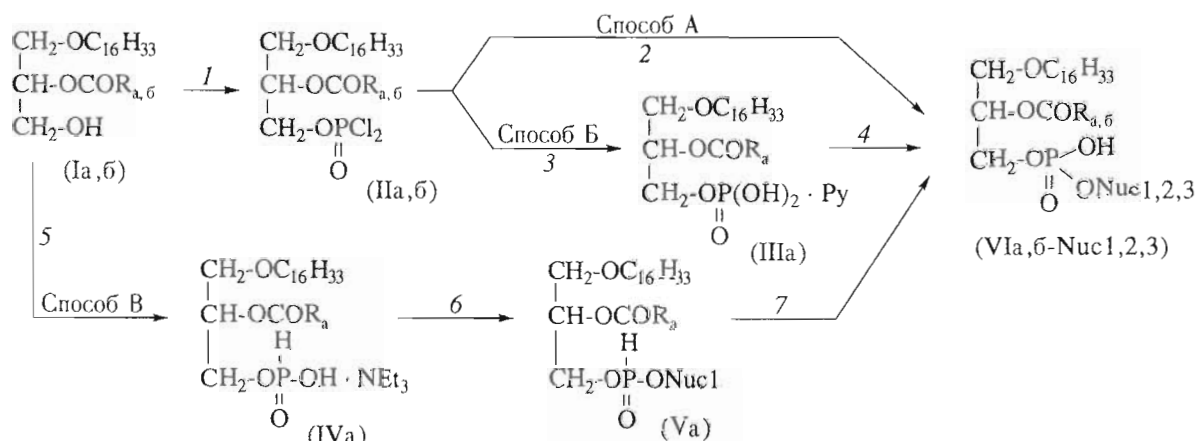
Естественно, что строение фосфолипидов должно влиять на способность конъюгатов преодолевать клеточные мембраны. Учитывая этот факт, в настоящей работе для конъюгации с нуклеозидами применяли смешанные алкилацильные глицерофосфаты. Конкретной целью исследования явилось изучение *rac*-1-гексадецил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфонуклеозидов (см. схему, соединения (VIa,б-Nuc1,2,3)*. В качестве ацильного заместителя мы использовали остатки пальмитиновой или метилкарбаминовой кислоты. Это позволяло соответственно повышать или по-

Сокращения: Nuc – нуклеозид, Thd – тимидин, TPSCl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, NPCl – 5,5-диметил-2-оксо-2-хлор-1,3,2-диоксафосфоринан, PivCl – пивалоилхлорид, d4T – 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин, FITC – флуоресцеинизотиоцианат.

[#] Автор для переписки.

*Для обозначения конъюгатов применяем следующие правила. Фосфолипидная часть указывается римской цифрой. При этом для фосфолипидов, содержащих в положении 2 глицеринового скелета остаток пальмитиновой кислоты, используется строчная буква "а", для фосфолипидов, содержащих остаток метилкарбаминовой кислоты, – строчная буква "б". Нуклеозидная часть указывается символом "Nuc" с порядковым номером нуклеозида. Фосфолипидная и нуклеозидная части соединяются через дефис (например: VIa-Nuc1).

Схема
Получение *rac*-1-гексадецил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфонуклеозидов



1 – $POCl_3/Et_3N$; 2 – Nuc1,2,3/Py, затем H_2O ; 3 – $H_2O (3^\circ C)/Py$; 4 – Nuc1/TPSCl; 5 – PCl_3/Im ; 6 – Nuc1/PivCl или Nuc1/NPCL; 7 – I_2/Py

нижать липофильность конъюгатов. В качестве нуклеозидов применяли соединения различного строения: один из эффективных нуклеозидов с высокой анти-ВИЧ-активностью – d4T (Nuc1) и два менее активных модифицированных нуклеозида – Nuc2 и Nuc3. Вещество Nuc2 – это 1-(*цис*-5-гидроксипентен-2-ил)тимин, представитель класса ациклических нуклеозидов; Nuc3 – это 2,3-изопропилиденуридин, нуклеозид с заместителем в рибозной части. Предполагалось, что присоединение фосфолипидного компонента к этим нуклеозидам позволит выявить изменения в активности, вносимые присутствием фосфолипидного фрагмента.

Конъюгаты синтезированы тремя способами, приведенными на схеме.

Исходными веществами для синтеза являлись *rac*-1-гексадецил-2-пальмитойлглицерин (Ia) или *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицерин (Iб).

Способ А представляет собой модифицированный метод Брокерхосфа и Эйенгара [5], примененный ими для синтеза фосфатидилхолинов из 1,2-диглицерида, хлороксида фосфора и тозилата холина. Образующийся на первой стадии фосфодихлорид (IIa) в описанном способе не выделяли. В нашем случае вместо тозилата холина был использован соответствующий нуклеозид, а в качестве дизамещенного глицерида – соединения (Ia, б). Нами недавно показано, что фосфодихлорид (IIa)

может быть выделен в индивидуальном состоянии и сохраняться в хлороформном растворе при 0–3°C [6]. При использовании хлороформного раствора фосфодихлорида (IIa) в качестве исходного соединения выход конъюгатов (VIa) значительно повышается.

В тех же условиях, что и соединение (IIa), может быть получен в индивидуальном состоянии и его аналог (IIб) (из *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицерида). Спектры 1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР подтвердили строение этого фосфодихлорида. Химический сдвиг атома фосфора у соединения (IIб) составляет 7.5 м.д. (у дихлорида (IIa) 7.7 м.д. [6]). Соединение (IIб) устойчиво в хлороформном растворе. Приведенный в работе [7] химический сдвиг атома фосфора для соединения (IIб), равный –4.2 м.д., отнесен авторами ошибочно, по-видимому, вследствие того, что это соединение из реакционной смеси в индивидуальном состоянии не было выделено.

Способ Б заключается в получении конъюгатов из производных фосфатидовых кислот. Фосфодихлорид (IIa) гидролизовали водой в присутствии основания (пиридина); образовавшуюся пиридиновую соль 1-гексадецил-2-пальмитойл-3-фосфатидовой кислоты (IIIa) затем в присутствии TPSCl обрабатывали соответствующим нуклеозидом. Выход конъюгата (VIa-Nuc1) составил 56% в расчете на глицерид (Ia).

Таблица 1. Коэффициенты распределения (P) конъюгатов на основе Nuc1 в системе 1-октанол – 0.08 М фосфатный буфер, pH 7.4*

Соединение	Nuc1	(VII-Nuc1)	(VIb-Nuc1)	(VIa-Nuc1)
P	0.25	2.1	10	42

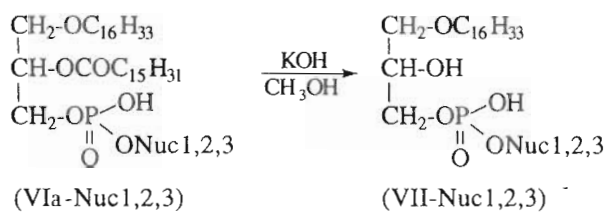
* Определены по методу [10, 11].

Описанный ранее [8] способ получения фосфатидовой кислоты гидролизом фосфодихлорида (IIa) водой в кислой среде, по-видимому, не приводит к образованию указанной кислоты. Нами было показано [6], что фосфатидовая кислота может образовываться из дихлорида (IIa) только в присутствии оснований, а в кислой среде образующаяся из него фосфатидовая кислота претерпевает деструкцию – происходит расщепление фосфоэфирной связи и миграция ацильной группы из положения 2 глицеринового скелета в положение 3.

Способ В представляет собой вариант известного Н-фосфонатного метода получения фосфолипидов [9], примененный нами для синтеза фосфатидилнуклеозидов с той разницей, что вместо 1,2-диацилглицерина в качестве исходного соединения был использован *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицерин.

Полученные указанными выше способами 5'-(1-гексадецил-2-ацил-*sn*-глицерофосфо)нуклеозиды (VIa,б-Nuc1,2,3) выделяли с помощью ТСХ или колоночной хроматографии. Их индивидуальность и строение были подтверждены с помощью ВЭЖХ, ТСХ и ЯМР-спектроскопии. По данным ВЭЖХ, содержание основного вещества составляло не менее 95%.

Соединения (VIa-Nuc1,2,3) при обработке спиртовым раствором КОН образуют соответствующие лизосоединения (VIIa-Nuc1,2,3):



Синтезированные конъюгаты (VIa,б-Nuc1,2,3) отличаются от нуклеозидов низкой растворимостью в воде (табл. 1). Из таблицы следует, что растворимость конъюгатов резко уменьшается по мере увеличения гидрофобности фосфолипидного компонента. По-видимому, конъюгаты в отличие от нуклеозидов образуют в водной среде мицеллы.

Для характеристики конъюгатов (VIa,б-Nuc1,2,3) в качестве потенциальных лекарственных средств представляет интерес изучение их гемолитического действия, поскольку известно

[12], что некоторые фосфолипиды, например лизофосфатидилхолина и другие родственные им вещества, вызывают лизис эритроцитов, что существенно ограничивает медицинское применение препаратов.

По методике [13] нами определены дозы веществ, вызывающие гемолиз 20% эритроцитов в 2.5 мл 0.1% суспензии, содержащей 2.5×10^7 клеток. Согласно табл. 2, эталонные соединения, *rac*-1-гексадецилглицеро-3-фосфохолин (лизо-ФАТ) и *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицеро-3-фосфохолин, вызывают лизис 20% эритроцитов в дозах 0.1 и 2 нмоль соответственно.

Показано, что замена холинового фрагмента на остаток нуклеозида приводит к снижению гемолитической активности соединений. Так, у 2-гидроксисоединений гемолитическая активность уменьшается в 50–100 раз (ср. опыты 1 и 12–13). У карбамоильных производных влияние замены менее выражено – отмечено снижение в 2–3 раза (ср. опыты 2 и 9–11). Гемолитическая активность полностью отсутствует у соединений (VIa-Nuc1,2,3), содержащих в положении 2 глицеринового скелета пальмитоильный остаток. По-видимому, среди конъюгатов последнего типа и следует сосредоточить дальнейший поиск лекарственных препаратов. Сами нуклеозиды гемолитически пассивны.

Ниже приведены предварительные данные испытаний анти-ВИЧ-активности некоторых синтезированных конъюгатов (VIIa-Nuc1,2,3) в опытах *in vitro*.

Испытания проводились в НИИЭиМ по схеме, предложенной агентством FDA (США) в 1989 г. для первичной оценки антивирусного действия вновь синтезированных соединений методами непрямой иммунофлуоресценции (определение уровня внутриклеточного антигена ВИЧ) и иммуноферментного анализа (определение уровня внеклеточного антигена) [14].

Из данных табл. 3 следует, что конъюгаты, содержащие фосфолипидный компонент (VIa), по антивирусной активности *in vitro* не уступают соответствующим нуклеозидам. Так, конъюгат (VIa-Nuc1) имеет примерно ту же активность, что и нуклеозид Nuc1, а конъюгаты (VIa-Nuc2) и (VIa-Nuc3) по активности значительно превосходят нуклеозиды Nuc2 и Nuc3 соответственно.

Все три конъюгата не обладают цитотоксичностью в концентрациях до 100 мкг/мл (предел наблюдений). Эти факты указывают на перспективность исследований в области синтеза конъюгатов типа *rac*-1-гексадецил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфонуклеозидов (ацил – остаток высшей кислоты).

Иначе обстоит дело, если в фосфолипидном компоненте конъюгата вместо пальмитоильного остатка находится остаток метилкарбаминовой кислоты (конъюгат (VIb-Nuc1)) или гидроксигруппа (конъюгаты (VII-Nuc1,2,3)). В этом случае

антивирусная активность конъюгатов по сравнению с нуклеозидами резко снижается. Кроме того, отмечено цитотоксическое действие конъюгата (VIб-Nuc1), проявленное в концентрации 50 мкг/мл в течение 24-часовой инкубации.

Дальнейшие исследования, по-видимому, целесообразно сосредоточить в области синтеза конъюгатов, включающих гомологи фосфолипидов типа (IIIа) и новые нуклеозиды.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезах использовали хлороксид фосфора, триэтиламин, пиридин, хлороформ, толуол, ацетон отечественного производства, очищенные перегонкой; *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицерин (Iа) синтезирован по способу [6], *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицерин (Iб) и *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицеро-3-фосфохолин – по способу [7], фосфоринан (NPCl) получен методом [15], нуклеозид d4T (Nuc1) – методом [16], 1-(*цис*-5-гидроксипентен-2-ил)тимин (Nuc2) наработан на кафедре биотехнологии МИТХТ по собственной методике [17]. 2',3'-Изопропил-иденуридин (Nuc3) приобретен у фирмы Pharma-Waldkof (Германия), пивалоилхлорид, треххлористый фосфор и имидазол – у фирмы Merck (ФРГ), *rac*-1-гексадецилглицеро-3-фосфохолин – у фирмы Sigma (США). Дейтерированные хлороформ (Janssen), вода и метиловый спирт (Гос. институт прикладной химии, Санкт-Петербург) использованы без дополнительной очистки.

Для аналитической и препаративной ТСХ применяли пластины Kieselgel 60 F-254 (Merck) в системах хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4 (А), хлороформ–метанол, 1 : 1 (Б), хлороформ–метанол, 3 : 1 (В). Обнаружение проводили парами иода, УФ-облучением, молибденовым синим [18] (для фосфорорганических соединений). Для колоночной хроматографии использовали Kieselgel 60 (Merck) или Silicagel L 100/160 (Kavalier, Чехословакия). Разделение веществ проводили в градиенте растворителей хлороформ – метанол.

Спектры ¹H-, ¹³C- и ³¹P-ЯМР получены на фурье-спектрометре Bruker AM-360 на частотах 360.13, 90.58 и 145.78 МГц соответственно. Внутренний эталон для ядер ¹H и ¹³C – тетраметилсилан, внешний эталон для ядер ³¹P – 85%-ная H₃PO₄. Приведены химические сдвиги в миллионных долях (м.д.) и константы спин-спинового расщепления в герцах (Гц).

rac-1-Гексадецил-2-метилкарбамоил-*sn*-глицеро-3-фосфодихлорид (IIб) получен в виде хлороформного раствора из *rac*-1-гексадецил-2-метилкарбамоилглицерина и хлороксида фосфора по ранее описанному способу получения фосфодихлорида (IIа) [6]. Выход близок к количественному. Спектры дихлорида (IIб) в растворе С²НСl₃

Таблица 2. Гемолитическая активность соединений

Опыт	Соединение	Активность*, нмоль
Эталонные соединения		
1	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-OC}_{16}\text{H}_{33} \\ \\ \text{CH-OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-OP} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$ лизо-ФАТ	0.1
2	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-OC}_{16}\text{H}_{33} \\ \\ \text{CH-OCONHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{-OP} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$ Нуклеозиды	2.1
3	Nuc1	Гемолитическая активность отсутствует**
4	Nuc2	
5	Nuc3	
Конъюгаты		
6	(VIа-Nuc1)	То же
7	(VIа-Nuc2)	
8	(VIа-Nuc3)	
9	(VIб-Nuc1)	3.8
10	(VIб-Nuc2)	4.9
11	(VIб-Nuc3)	3.8
12	(VII-Nuc1)	8.0
13	(VII-Nuc2)	6.0
14	(VII-Nuc3)	8.8

* Количество соединения, вызывающее гемолиз 20% эритроцитов, содержащихся в 2.5 мл 0.1% суспензии.

** Для нуклеозидов (опыты 3–5) гемолиз полностью отсутствовал в дозе 5 × 10³ нмоль, для конъюгатов (опыты 6–8) – в дозе 5 × 10² нмоль (предельная доза при испытаниях).

регистрировали при 3°С. ³¹P-ЯМР: 7.5 (т, J_{р,н} 9.6). ¹³C-ЯМР: 14.2 (СН₃), 22.7, 25.9, 29.4, 29.6, 31.9 (СН₂)_н, 27.5 (NCH₃), 67.6 (Cl Gro), 69.8 (J_{с,р} 8.9, С3 Gro), 69.9 (J_{с,р} 9.5, С2 Gro), 155.7 (СО). ¹H-ЯМР: 0.86 (3H, т, СН₃), 1.26 (26H, м, (СН₂)₁₃СН₃), 1.55 (2H, м, ОСН₂СН₂), 2.82 (3H, д, NCH₃), 3.45 (2H, м, СН₂ОСН₂(СН₂)_н), 3.60 (2H, м, СН₂ОСН₂), 4.5 (2H, м, СН₂ОР), 5.10 (1H, м, СН).

5'-(*rac*-1-Гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (VIа-Nuc1).

Способ А. К раствору 230 мг (1.5 ммоль) хлороксида фосфора в 5 мл сухого хлороформа, охлажденному до 0°С, добавляли при перемешивании в атмосфере аргона раствор 660 мг (1.2 ммоль) глицерида (Iа) и 150 мг (1.5 ммоль) триэтиламина

Таблица 3. Анти-ВИЧ-1-активность соединений, тестированных на высокочувствительной к ВИЧ Т-лимфобластоидной линии клеток человека МТ4

Соединение	Активность, мкг/мл*
Nuc1	0.5
(VIa-Nuc1)	0.5
(VIb-Nuc1)	10.0
(VII-Nuc1)	>100
Nuc2	50
(VIa-Nuc2)	5.0
(VII-Nuc2)	>100
Nuc3	50.0
(VIa-Nuc3)	5.0
(VII-Nuc3)	>100

* Концентрация соединений (мкг/мл), вызывающая 100% ингибирование репродукции ВИЧ.

в 30 мл сухого хлороформа. Через 1 ч к реакционной массе добавляли 3 мл пиридина и 250 мг (1.2 ммоль) нуклеозида Nuc1. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре ориентировочно 8 ч до исчезновения глицерида (Ia) и нуклеозида Nuc1 (контроль ТСХ, система А), затем добавляли 2 мл воды, перемешивали еще 4 ч, добавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (2 × 30 мл), образующуюся эмульсию разрушали метанолом, органический слой сушили (MgSO₄), упаривали, остаток разделяли с помощью ТСХ (пластины Мерск, толщина слоя 2 мм, система А, для извлечения – система Б). Получено 462 мг (47.3%) конъюгата (VIa-Nuc1), аморфное вещество; ТСХ: R_f 0.4 (А).

³¹P-ЯМР (C²HCl₃, C²H₃O²N): -1.13 (с). ¹H-ЯМР: 0.88 (6H, м, 2CH₃), 1.15–1.25 (50 H, м, (CH₂)₁₂CH₃ и (CH₂)₁₃CH₃), 1.5–1.6 (4H, м, OCH₂CH₂ и C(O)CH₂CH₂), 1.85 (3H, с, CH₃ Thd), 2.33 (2H, м, C(O)CH₂), 3.3 (2H, м, OCH₂CH₂(CH₂)_n), 3.45 (2H, м, CH₂ Gro), 3.93 (2H, м, CH₂OP), 4.13 (2H, м, H5' Thd), 4.85 (1H, м, H4' Thd), 5.3 (1H, м, CH Gro), 5.73 (1H, д, H2' Thd), 6.27 (1H, д, H3' Thd), 6.85 (1H, м, H1' Thd), 7.43 (1H, с, H6 Thd). Отнесение сигналов протонов в группах P–O–CH₂ (Gro) и P–O–CH₂ (Nuc1) проводилось с помощью экспериментов по двумерной гомо- и гетероядерной корреляции химических сдвигов [19].

Аналогично получены конъюгаты (VIa-Nuc2) и (VIa-Nuc3) (с применением соответствующих нуклеозидов вместо нуклеозида Nuc1).

При использовании глицерида (Ib) по способу А получен конъюгат (VIb-Nuc1).

³¹P-ЯМР (C²HCl₃, C²H₃O²N): -5.9 (с). ¹H-ЯМР: 0.88 (6H, т, CH₃), 1.24 (26H, м, (CH₂)₁₃CH₃), 1.60 (2H, м, OCH₂CH₂), 1.95 (3H, с, CH₃ Thd), 2.98 (3H,

д, NCH₃), 3.48 (2H, м, OCH₂CH₂), 3.62 (2H, м, CH₂OCH₂), 3.74 (2H, м, CH₂OP), 4.00 (2H, м, H5' Thd), 4.84 (2H, м, H4' Thd), 5.05 (1H, м, CH Gro), 5.84 (1H, д, H2' Thd), 6.33 (1H, д, H3' Thd), 6.98 (1H, с, H1' Thd), 7.48 (1H, с, H6 Thd).

Способ Б. К раствору 680 мг (4.4 ммоль) хлороксида фосфора в 5 мл сухого хлороформа при перемешивании и охлаждении (0°C) добавляли в течение 20 мин в атмосфере аргона раствор 500 мг (0.9 ммоль) глицерида (Ia) и 350 мг (4.4 ммоль) пиридина в 10 мл сухого хлороформа, реакционную массу выдерживали 0.5 ч при 0°C, промывали холодной водой (2 × 5 мл). Полученный хлороформный раствор 1-гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицерофосфодихлорида (IIa) [6] добавляли по каплям при перемешивании и охлаждении (0°C) к 10 мл 50% водного раствора пиридина, нижний слой отделяли (для лучшего разделения слоев добавляли CH₃OH) и упаривали. После сушки в вакууме получено 500 мг (79%) пиридиниевой соли 1-гексадецил-2-пальмитоил-3-фосфатидовой кислоты (IIIa), аморфное вещество; ТСХ: R_f 0.28 (А).

³¹P-ЯМР: 0 (т, J_{P,H} 8.8). ¹³C-ЯМР: 64.8 (J_{C,P} 5.4, C3 Gro), 69.5 (C1 Gro), 72.1 (J_{C,P} 8.2, C2 Gro), 72.2 (OCH₂). ¹H-ЯМР: 0.85 (6C, т, 2CH₃), 1.25 (50 H, уш.с., (CH₂)₁₂CH₃ и (CH₂)₁₃CH₃), 1.53 (4H, м, OCH₂CH₂ и C(O)CH₂CH₂), 2.35 (2H, т, C(O)CH₂), 3.46 (2H, м, CH₂ Gro), 3.63 (2H, м, CH₂OCH₂), 4.05 (2H, м, CH₂OP), 5.17 (1H, м, CH Gro).

Смесь 315 мг (0.45 ммоль) соли (IIIa), 74 мг (0.33 ммоль) нуклеозида Nuc1 и 0.34 г (1.11 ммоль) сульфохлорида TPSCl в 10 мл сухого пиридина перемешивали 24 ч при комнатной температуре, растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли толуол, отфильтровывали осадок пиридиниевой соли TPS, фильтрат упаривали в вакууме досуха. Осадок конъюгата (VIa-Nuc1) очищали с помощью ТСХ. Получено 200 мг (56%) конъюгата (VIa-Nuc1), R_f 0.39 (А).

Данные ¹H-, ¹³C- и ³¹P-ЯМР-спектров совпадают с данными для конъюгата (VIa-Nuc1), полученного способом А.

Способ В. В результате взаимодействия 850 мг (1.4 ммоль) глицерида (Ia), 720 мг (5.2 ммоль) треххлористого фосфора и 1.66 г (2.43 ммоль) имидазола по способу [9] получали 750 мг (77.6%) триэтиламониевой соли 1-гексадецил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-Н-фосфоната (IVa), аморфное вещество, ТСХ: R_f 0.7 (А) и 0.52 (В).

³¹P-ЯМР: 4.6 (J_{P,H} 623.7, ³J_{P,H} 6.75). ¹H-ЯМР: 0.87 (6H, м, 2CH₃), 1.22 (50 H, м, (CH₂)₁₂CH₃ и (CH₂)₁₃CH₃), 1.30 (9H, т, CH₃CH₂N), 1.53 (2H, м, OCH₂CH₂), 1.61 (2H, м, C(O)CH₂CH₂), 2.31 (2H, м, C(O)CH₂), 3.08 (6H, кв, CH₂N), 3.42 (2H, м, OCH₂(CH₂)_n), 3.56 (2H, м, CH₂ Gro), 4.00 (2H, м,

CH₂OP), 5.16 (1H, м, CH Gro), 6.83 (1H, д, J_{p,h} 623.7, PH), 12.8 (1H, с, POH).

К раствору 130 мг (0.21 ммоль) соли (IVa), 90 мг (0.4 ммоль) нуклеозида Nuc1 и 22 мг (0.21 ммоль) триэтиламина в 3 мл сухого пиридина при перемешивании и 0°C прибавляли 0.078 мл (0.63 ммоль) пивалоилхлорида, перемешивали 1.5 ч при 20°C, приливали раствор 150 мг I₂ в 5 мл смеси Py-H₂O, 4 : 1, перемешивали 15 мин, добавляли 100 мл хлороформа, промывали 5% водным Na₂S₂O₃ (2 × 40 мл), водой (3 × 40 мл), высушивали (MgSO₄) и упаривали. Из остатка хроматографией на силикагеле выделяли 35 мг (19%) конъюгата (VIa-Nuc1). ТСХ: R_f 0.4 (A).

Данные ЯМР-спектров идентичны полученным ранее для этого конъюгата.

Выход конъюгата (VIa-Nuc1) повышается до 37% при применении вместо PivCl стехиометрического количества NPCl.

гас-1-Гексадецил-sn-глицеро-3-фосфо-2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (VIIa-Nuc1). К раствору 165 мг (0.2 ммоль) конъюгата (VIa-Nuc1) в 20 мл хороформа при перемешивании добавляли 0.33 M раствор KOH в метиловом спирте до достижения в реакционной массе pH 9. После выдержки в течение примерно 2 ч (контроль с помощью ТСХ) реакционную массу нейтрализовали 3 н. раствором HCl, экстрагировали хлороформом, органический слой высушивали (MgSO₄). После отгонки растворителя с помощью ТСХ выделено 85 мг (70%) вещества (VII-Nuc1). ТСХ: R_f 0.37 (A).

³¹P-ЯМР (C²HCl₃, C²H₃O²H): 1.0. ¹H-ЯМР: 0.88 (3H, м, CH₃), 1.15–1.35 (26H, м, (CH₂)₁₃CH₃), 1.56 (2H, м, OCH₂CH₂), 1.93 (3H, с, CH₃ Thd), 3.45 (4H, м, OCH₂(CH₂)_nCH₃, CH₂ Gro), 4.07 (2H, м, CH₂OP), 4.24 (2H, м, H5' Thd), 4.99 (1H, м, H4' Thd), 5.85 (1H, д, H2' Thd), 6.44 (1H, д, H3' Thd), 6.98 (1H, м, H1' Thd), 7.79 (1H, с, H6 Thd).

Аналогичным способом из соответствующих конъюгатов (VIa-Nuc2) и (VIa-Nuc3) получены соединения (VII-Nuc2) и (VII-Nuc3).

Гемолитическое действие препаратов определяли модифицированным методом [12, 13] на 0.1% суспензии человеческих эритроцитов (2.5 мл суспензии, 2.5 × 10⁷ клеток) в изотоническом трис-HCl-буфере. Инкубацию образцов исследуемых веществ с суспензией эритроцитов проводили при 37°C в течение 30 мин, после чего образцы центрифугировали (3000 об/мин, 10 мин) и измеряли поглощение (λ 420 нм) в супернатанте. Степень гемолиза рассчитывали по отношению к поглощению образцов полностью гемолизированных и нативных эритроцитов.

Анти-ВИЧ-активность испытуемых препаратов определяли на высокочувствительной к ВИЧ Т-лимфобластоидной культуре клеток человека MT4 [20]. В качестве источника вируса использо-

вали клеточную линию HTHIV27 [21], хронически продуцирующую недефектный ВИЧ-1.

В 24-луночные планшеты (Nunc, Дания) вносили клетки в концентрации 5 × 10⁵ кл/мл в среде культивирования RPMI 1640 (Serva, США) с 10% эмбриональной сыворотки коров (производство НИИЭиМ) и стандартной концентрацией гентамицина. Опытные и контрольные образцы клеток были предварительно инфицированы вирусосодержащей культуральной жидкостью в течение 1 ч при 37°C и после отмывания от несвязавшегося вируса обработаны испытуемыми соединениями в концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 и 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали инфицированные клетки, обработанные и не обработанные калиброванными образцами азидотимидина (Sigma) в концентрации 0.1 мкг/мл. Все культуры инкубировали при 37°C в атмосфере 4.5% CO₂ в течение 7 сут.

Антивирусную активность соединений регистрировали двумя методами:

1) в реакции непрямой иммунофлуоресценции с поливалентной антисывороткой от ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом людей в разведении 1 : 10 для выявления внутриклеточного антигена (АГ) ВИЧ с использованием FITC-конъюгированных античеловеческих кроличьих антител;

2) методом иммуоферментного анализа (ИФА) для определения внеклеточного АГ р24 в вирусосодержащей клеточной культуральной жидкости с помощью "ловушечного" ИФА (capture ELISA, тест-система Abbot, США).

Процедура тестирования для отдельных соединений проводилась в двукратных повторностях.

Острую цитотоксичность соединений регистрировали в инвертированном микроскопе (20-кратное увеличение) на этих же клетках (MT4) через 24 ч после внесения препаратов. Критерием цитотоксичности являлась тотальная гибель клеток.

Работа выполнена при поддержке Международного научно-технического центра (грант № 127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6112–6117.
2. Steim I.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. Водовозова Е.Л., Павлова Ю.Б., Полушкина М.А., Ржанинова А.А., Гараев Н.Н., Молотковская Ю.Г. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 451–457.
4. Piantadosi C., Marasco C.J., Morris-Nataschke S.L., Meyer K.L., Gumus F., Surles J.R., Ishaq K.S., Ku-

- cera L.S., Iyer N., Wallen C.A., Piantadosi S., Modest E.I. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. P. 1408–1414.
5. Brockerhoff H., Ayengar N.K.N. // *Lipids.* 1979. V. 14. P. 88–89.
6. Малекин С.И., Хромова Н.Ю., Кисин А.В., Аксенова М.Ю., Кругляк Ю.Л., Курочкин В.К. // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 617–621.
7. Surlis J.R., Marx M.H., Piantadosi C. // *J. Org. Chem.* 1988. V. 53. P. 899–901.
8. Hong C.I., An S.H., Buchheit D.J., Nechaev A., Kirisits A.I., West C.R., Berdel W.E. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 2038–2044.
9. Lindh I., Stawinski I. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 1338–1342.
10. Kessel D. // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. P. 4739.
11. Kerr S.G., Kalman T.J. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 1996–2001.
12. Matsuzaki K., Handa T., Miyajima K., Mikura Y., Shimizu H., Toguchi H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1988. V. 36. P. 4253–4260.
13. Mar A., Michl H. // *Toxicon.* 1976. V. 14. P. 191–195.
14. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А. СПИД. М.: Народная академия культуры и общечеловеческих ценностей, 1992. С. 273–282.
15. McConnell R.L., Coower H.W. // *J. Org. Chem.* 1959. V. 24. P. 630–635.
16. Mansuri M.M., Starrett J.E., Ghazzouli I., Hitchcock M.J.M., Sterzycki R.Z., Brankovan V., Lin T.-S., August E.M., Prusoff W.H., Sommadossi I.-P., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. P. 461–466.
17. Мицнер Б.И., Кочеткова М.В., Филиппов Д.В., Цытович А.В., Дяткина Н.Б. // *Молекулярная биология.* 1993. Т. 27. С. 174–184.
18. Vaskovsky V.E., Svetashev V.I. // *J. Chromatogr.* 1972. V. 65. P. 451.
19. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М.: Мир, 1992. С. 281–327, 350–358.
20. Miyoschi I., Kabamoto L., Tokana I. // *Nature.* 1981. V. 294. P. 770–771.
21. Miller G.G., Bykovsky A.Ph., Pokidysheva L.N., Titova I.V. // *VIII Int. Conf. AIDS, V. 3, Amsterdam, 1992.* P. 29.

New Nucleoside Conjugates with Phospholipids: Synthesis and Anti-HIV Activity of *rac*-1-Hexadecyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphonucleosides

S. I. Malekin*, Yu. L. Kruglyak*, N. Yu. Khromova*, M. Yu. Aksenova*, V. P. Sokolov*,
A. V. Kisin*, T. I. Novozhilova*, S. G. Popova*, V. K. Kurochkin*,
G. G. Miller**, and L. N. Pokidysheva**

*State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, sh. Entuziastov 23, Moscow, 111024 Russia

**Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Abstract—New nucleoside–phospholipid conjugates were synthesized based on 1,2-disubstituted glycerides and nucleosides. These contain *rac*-1-hexadecyl-2-palmitoyl (or 2-methylcarbamoyl)-*sn*-glycero-3-phosphate as the phospholipid component and 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, 1-(*Z*-5-hydroxypentene-2-yl)thymine, or 2',3'-isopropylideneuridine as a nucleoside component. The conjugates were synthesized by three different ways: from *rac*-1-hexadecyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphodichlorides, -3-phosphatidic acids, or -3-H-phosphonates. When subjected to mild alkaline hydrolysis, conjugates containing a 2-palmitoyl group formed conjugates with the lysophospholipid component that had not yet been described. All the conjugates obtained were amorphous compounds stable at room temperature. Their hemolytic and anti-HIV activities were determined. Some conjugates were found to completely inhibit *in vitro* HIV-1 reproduction in lower doses than the corresponding nucleosides.

Key words: phospholipid, 1-alkyl-2-acylglycerol, glycerophosphate, nucleoside, hemolysis, anti-HIV activity