



УДК 577.113.3.017

5'-ФОСФОНАТЫ 4'-ТИО-5-ЭТИЛ-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА: СИНТЕЗ И АНТИВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА

© 2002 г. Л. А. Александрова^{##}, В. Л. Андропова^{**}, И. Л. Карпенко^{*},
Ю. С. Скоблов^{*}, А. Адани^{*}, Г. А. Галегов^{**}

^{*} Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

^{**} Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

Поступила в редакцию 02.07.2001 г. Принята к печати 16.01.2002 г.

Осуществлен синтез 5'-фосфонатов 4'-тио-5-этил-2'-дезоксинуридина (TEDU). Показано, что в культуре клеток Vero все полученные соединения обладали низкой цитотоксичностью и за исключением 5'-фторфосфата TEDU проявляли антигерпетическую активность, сравнимую с таковой для 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанина (ацикловира) и 9-(1,3-дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанина (ганцикловира). 5'-Этоксикарбонилфосфонат TEDU и 5'-аминокарбонилфосфонат TEDU подавляли также репродукцию вируса герпеса простого типа 1, резистентного к ацикловиру.

Ключевые слова: фосфонаты нуклеозидов; противовирусные препараты; вирус герпеса простого.

ВВЕДЕНИЕ

В практической медицине для лечения инфекционных вирусных заболеваний широко используются модифицированные нуклеозиды и их аналоги. Так, для лечения герпесвирусной инфекции человека применяются ацикловир (ACV), ганцикловир (GCV), бромвинилдезоксинуридин (BVDU) и др., а для подавления вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) – 3'-азидо-3'-дезокситимидин, 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин, 2',3'-дидезоксиинозин и др. Мишенью для этих соединений являются вирус-индуцированные ДНК-синтезирующие ферменты – ДНК-полимераза вируса герпеса и обратная транскриптаза ВИЧ соответственно. Включение модифицированных нуклеозидов (после их фосфорилирования в клетке до соответствующих 5'-трифосфатов) во вновь синтезируемую цепь ДНК приводит к терминации процесса репликации вирусов. Существенным недостатком использования этих модифицированных нуклеозидов в качестве лекарств является их высокая токсичность [1, 2].

Сравнительно недавно было показано, что ряд 5'-фосфонатных производных модифицирован-

ных нуклеозидов обладают высокой противовирусной активностью и при этом малотоксичны [1–6]. Ярким примером служит 5'-*H*-фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (никавир®), используемый в настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции.

4'-Тео-2'-дезоксинуклеозиды интенсивно изучаются как потенциальные противовирусные (в первую очередь, антигерпетические) агенты с 1978 г. [7–14], когда был получен первый в этом ряду 5'-фтор-4'-тио-2'-дезоксинуридин [13]. Среди многих синтезированных с того времени 4'-тио-2'-дезоксинуклеозидов наиболее широким спектром активности против вирусов, входящих в семейство герпесвирусов, обладал TEDU [10, 14]. Детальное изучение противовирусной активности TEDU показало, что мишенью в данном случае является не только вирусная ДНК-полимераза, но и вирус-индуцированная тимидинкиназа [15]. TEDU фосфорилируется исключительно тимидинкиназой вируса герпеса, а активность соответствующего клеточного фермента подавляет. Более того, TEDU устойчив к действию тимидинфосфорилазы и пиримидинфосфорилазы, что снижает скорость его катаболизма.

Однако, несмотря на высокую противовирусную активность и низкую цитотоксичность в культурах клеток, предварительные исследования выявили высокую токсичность TEDU при испытаниях на лабораторных животных. Поэтому целью данной работы – синтез 5'-фосфонатных производных TEDU (**Ia**)–(**Ie**), изучение их цитотоксичности и способности подавлять репродукцию вируса герпеса, а также определение стабильности

Сокращения: PBS – фосфатно-солевой буфер; ACV – ацикловир, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин; GCV – ганцикловир, 9-(1,3-дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанин; BVDU – бромвинилдезоксинуридин, [(*E*)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксинуридин; АгаА – 9-(β-*D*-арабинофуранозил)аденин; PFA – тринатриевая соль фосфономуравьиной кислоты; TEDU – 4'-тио-5-этил-2'-дезоксинуридин; ВПГ – вирус герпеса простой; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ЦПД – цитопатогенное действие вируса.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: chemov@imb.imb.ac.ru).

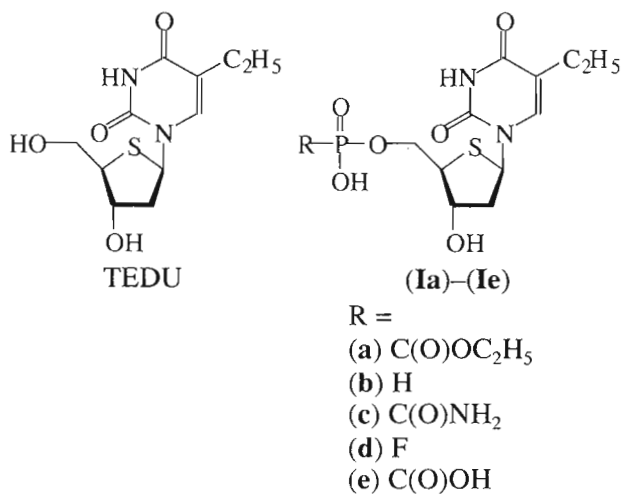
Таблица 1. Выходы и физико-химические свойства 5'-фосфонатов TEDU (**Ia**)–(**Ie**)

| Соединение | Выход, % | ³¹ P-ЯМР (D ₂ O), δ, м.д. | m/z, [M] ⁺ |
|---------------|----------|--|-----------------------|
| (Ia) | 57 | –3.9 с | 408 |
| (Ib) | 63 | 7.2 с | 336 |
| (Ic) | 85 | –2.7 с* | 379 |
| (Id) | 54 | –6.4 д (J 934 Гц) | 355 |
| (Ie) | 92 | 1.2 с | 380 |

* DMSO-d₆.

наиболее перспективных соединений в фосфатно-солевом буфере и сыворотке крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ



5'-Фосфонаты TEDU (**Ia**), (**Ib**) и 5'-фторфосфат TEDU (**Id**) получали конденсацией нуклеозида с соответствующими фосфоновыми кислотами в присутствии DCC или 2,4,6-триизопропилбензол-

сульфонилхлорида и согласно методикам, описанным в работе [6]. При взаимодействии TEDU с этоксикарбонилфосфоновой кислотой в присутствии DCC основным продуктом был фосфонат (**Ia**), выделенный с выходом 57%. В то же время при конденсации TEDU как с фосфористой, так и с фторфосфорной кислотами в аналогичных условиях образовывались смеси 5'- и 3'-производных. В связи с этим для синтеза 5'-*H*-фосфоната TEDU (**Ib**) и 5'-фторфосфата TEDU (**Id**) мы использовали 3'-*O*-ацетил-TEDU [16]. После деблокирования водным раствором аммиака соединения (**Ib**) и (**Id**) были выделены с выходами 63 и 54% соответственно. Обработка фосфоната (**Ia**) 32% NH₄OH позволила получить 5'-аминокарбонилфосфонат (**Ic**) с выходом 85%. 5'-Карбоксифосфонат TEDU (**Ie**) получали гидролизом соединения (**Ia**) 0.5 М KOH. Все 5'-фосфонаты TEDU имели характерный для TEDU УФ-спектр (λ_{max} 272, λ_{min} 240 нм). Структура соединений была подтверждена ¹H-, ³¹P-ЯМР- и масс-спектрами (табл. 1 и 2).

Мы изучили гидролиз соединения (**Ia**) в PBS и в нормальной сыворотке крови человека. В обоих случаях сначала наблюдали образование 5'-карбоксифосфоната TEDU (**Ie**), который далее превращался в TEDU (табл. 3, рис. 1а, б). Полученные данные свидетельствуют о высокой стабильности соединения (**Ia**) в PBS. Гидролиз в сыворотке крови человека происходил значительно быстрее: через 24 ч в инкубационной смеси оставалось около 40% соединения (**Ia**).

Было изучено проникновение в клетку и поведение TEDU и соединения (**Ia**) в культуре клеток Vero, неинфицированных и зараженных ВПГ (тип 1). После инкубации культуры неинфицированных клеток Vero с TEDU и соединением (**Ia**) в клеточных лизатах достоверно обнаруживаются оба соединения (табл. 4 и 5). Это означает, что оба соединения проникают в клетку в количестве не менее 50 пмоль на 1 млн. клеток.

Таблица 2. Данные ¹H-ЯМР-спектров синтезированных 5'-фосфонатов TEDU (**Ia**)–(**Ie**) (D₂O; δ, м.д., J, Гц)

| Соединения | H6(Ura) | H1' | H3' | H4' | H5' _{a, b} | H2' _{a, b} | $\frac{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\text{(Ura)}}$ | $\frac{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\text{(Ura)}}$ | Другие протоны |
|----------------|---------|------------------|--------|--------|-----------------------------|-----------------------------|---|---|--|
| (Ia) | 7.78 с | 6.25 дд (2; 7.5) | 4.53 м | 3.53 м | 3.87–3.94 м; 3.96–4.02 м | 2.34–2.38 м; 2.22–2.29 м | 2.22–2.29 м | 0.97 т (7.5) | 1.18 дт (1.1; 7.1) (CH ₃); 4.14–4.18 м (CH ₂) |
| (Ib) | 77.7 с | 6.25 дд (2; 7.5) | 4.52 м | 3.55 м | 3.86–3.93 м; 3.96–4.20 м | 2.32–2.39 м; 2.22–2.28 м | 2.21–2.28 м | 1.00 т (7.5) | 6.69 д (632) (H–P) |
| (Ic)* | 7.72 с | 6.31 дд (2; 7.4) | 4.42 м | 3.49 м | 3.85–4.02 м | 2.20–2.31 м; 2.10–2.17 м | 2.20–2.31 м | 1.03 т (7.5) | 7.2 с (NH ₂ CO) |
| (Id) | 7.77 с | 6.26 дд (2; 7.5) | 4.89 м | 3.64 м | 3.75–3.78 м | 2.54–2.62 м; 2.35–2.42 м | 2.25 дд | 1.02 т (7.5) | – |
| (Ie) | 7.77 с | 6.22 дд (2; 7.5) | 4.54 м | 3.47 м | 3.81–3.97 м | 2.26–2.34 м; 2.16–2.24 м | 2.16–2.24 м | 0.94 т (7.5) | – |

* ¹H-ЯМР-спектр регистрировали в DMSO-d₆, дополнительные протоны: 5.26 с (1H, OH); 11.32 с (1H, NH).

Таблица 3. Стабильность соединения (**Ia**) в PBS и нормальной сыворотке крови человека*

| Время инкубации, ч | Гидролиз в PBS | | | Гидролиз в сыворотке крови | | |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------|------|-------------------------------|--------------------------|------|
| | Соединение (Ia)**, % | Продукты гидролиза, % | | Соединение (Ia)**, % | Продукты гидролиза, % | |
| | | соединение (Ie) | TEDU | | соединение (Ie) | TEDU |
| 0 | 100 | – | – | 100 | – | – |
| 3 | н.о.*** | н.о. | н.о. | 72 | 26 | 2 |
| 7 | 92 | 8 | – | 47 | 50 | 3 |
| 24 | 87 | 9 | 4 | 40 | 51 | 9 |

* По данным ВЭЖХ (рис. 1а, б, условия см. “Эксперимент. часть”).

** Исходная концентрация 1 мМ.

*** н.о. – не определяли.

Таблица 4. Содержание TEDU в клеточном лизате после инкубации культуры клеток Vero с TEDU*

| Время инкубации, ч | Неинфицированная культура клеток | | | Инфицированная культура клеток | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------|--------------------------------|--|----------|
| | TEDU**, % | неидентифицированные соединения клеточного лизата, % | | TEDU**, % | неидентифицированные соединения клеточного лизата, % | |
| | | группа 6 | группа 7 | | группа 6 | группа 7 |
| 0 | 2 | 45 | 53 | 2 | 45 | 53 |
| 7 | 2.5 | 47 | 50.5 | 5 | 40 | 55 |
| 24 | 4 | 50 | 46 | 1 | 42 | 57 |
| 24*** | н.о.**** | н.о. | н.о. | 0 | 43 | 57 |

* По данным ВЭЖХ (рис. 1в, условия см. “Эксперимент. часть”).

** Исходная концентрация 150 мкМ.

*** Контрольная проба (инкубация без препарата).

**** н.о. – не определяли.

Таблица 5. Содержание соединения (**Ia**) и TEDU в клеточном лизате после инкубации культуры клеток Vero с соединением (**Ia**)*

| Время инкубации, ч | Неинфицированная культура клеток | | | | Инфицированная культура клеток | | | |
|--------------------|----------------------------------|------|--|----------|--------------------------------|------|--|----------|
| | (Ia)**, % | TEDU | неидентифицированные соединения клеточного лизата, % | | (Ia)**, % | TEDU | неидентифицированные соединения клеточного лизата, % | |
| | | | группа 6 | группа 7 | | | группа 6 | группа 7 |
| 0 | 1 | 0 | 76 | 23 | 1 | 0 | 76 | 23 |
| 7 | 2 | 2 | 23 | 73 | 3 | 0 | 49 | 48 |
| 24 | 0.5 | 2.5 | 40 | 57 | 2 | 0 | 40 | 58 |
| 24*** | н.о.**** | н.о. | н.о. | н.о. | 0 | 0 | 43 | 57 |

* По данным ВЭЖХ (рис. 1в, условия см. “Эксперимент. часть”).

** Исходная концентрация 125 мкМ.

*** Контрольная проба (инкубация без препарата).

**** н.о. – не определяли.

Следует отметить, что в клеточном лизате неинфицированных клеток Vero после их инкубации с соединением (**Ia**) обнаружены как соединение (**Ia**), так и TEDU (рис. 1в, пики 5 и 4 соответственно). Можно предположить, что это обусловлено гидролизом соединения (**Ia**) в клетках Vero (ана-

логично его гидролизу в сыворотке крови человека, см. табл. 3). По-видимому, скорости проникновения в клетки TEDU и соединения (**Ia**) сопоставимы (табл. 4 и 5).

Интересно, что в инфицированных клетках Vero утилизация TEDU происходит быстрее, чем

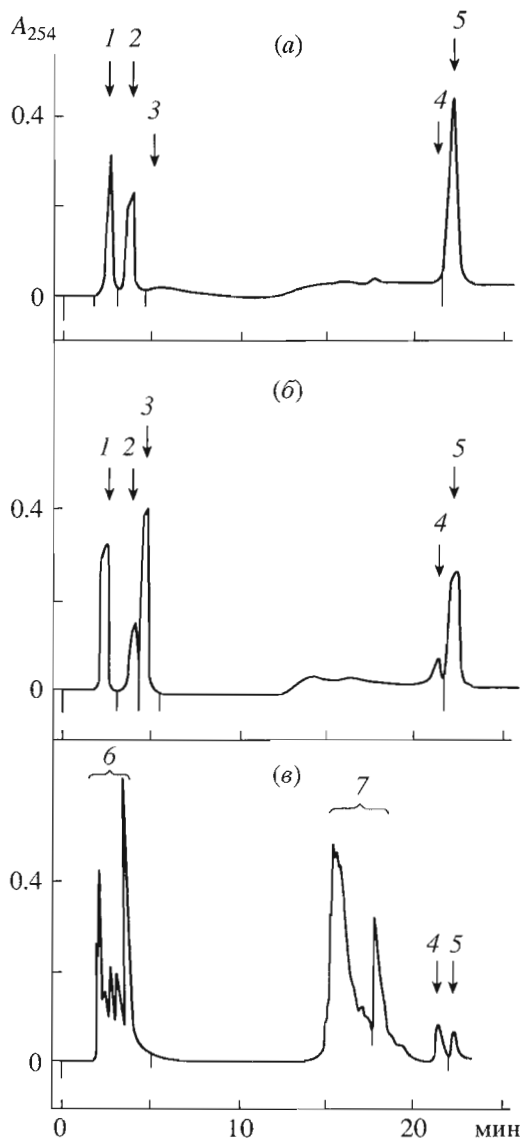


Рис. 1. Данные ВЭЖХ-анализа продуктов конверсии соединения (Ia) в нормальной сыворотке крови человека (а, б) и в культуре клеток Vero (в). Времена инкубации: 0 (а); 7 ч (б, в). Стрелками указаны пики, соответствующие по времени удерживания: 1, 2 – остаточным соединениям из сыворотки; 3 – соединению (Ic); 4 – TEDU; 5 – соединению (Ia); 6 и 7 – неидентифицированным соединениям клеточного лизата. Условия элюции: раствор А – 5 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 4,8); раствор В – 66% этанол; 0–5 мин – раствор А, 5–10 мин – 0 → 31% раствор В, 10–37 мин – 31 → 32% раствор В.

образование TEDU из соединения (Ia) (см. табл. 4 и 5). Дальнейшие исследования на лабораторных животных покажут, будет ли такое “замедление” усвоения TEDU инфицированными клетками за счет медленного метаболизма соединения (Ia) приводить к снижению токсичности препарата.

Мы изучили антивирусное действие синтезированных соединений на трех штаммах ВПГ-1:

чувствительного к АСВ (штамм L₂), резистентного к АСВ (штамм L₂/R) и резистентного к комбинации АСВ и РФА [штамм F(+)]. Антигерпетическую активность препаратов оценивали по способности изучаемых соединений ингибировать развитие вирус-индуцированного ЦПД на 50% (ИД₅₀) по сравнению с полным ЦПД в контрольных инфицированных культурах, а также по способности соединений полностью предотвращать развитие вирус-индуцированного ЦПД (ИД₉₅) [17, 18]. Другой метод, который мы применили для оценки антивирусного действия, – метод снижения инфекционного титра вируса [19].

Результаты изучения антигерпетической активности синтезированных 5'-фосфонатов TEDU (Ia)–(Id) в культуре клеток Vero представлены в табл. 6. Из приведенных результатов следует, что все изучаемые соединения обладали низкой цитотоксичностью. TEDU и его 5'-фосфонаты (Ia) и (Ic), содержащие модифицированные остатки фосфономуравьиной кислоты, обладали высокой антигерпетической активностью и вполне достоверной способностью подавлять репродукцию герпетической инфекции в отношении штамма ВПГ, чувствительного к ацикловиру (ВПГ/L₂). На штамме ВПГ-1 антивирусная активность TEDU и его 5'-фосфонатов (Ia) и (Ic) хорошо сравнима с активностью известных нуклеозидных препаратов. В случае штамма ВПГ, резистентного к ацикловиру (ВПГ/L₂/R), индекс селективности (ИС) соединений (Ia) и (Ic) заметно превышал ИС референс-препаратов, однако был значительно ниже, чем у TEDU. Важно, что селективный ингибирующий эффект изученных соединений (Ia)–(Ic) проявлялся в концентрациях, полностью подавляющих развитие вирус-индуцированного ЦПД (ИД₉₅). С другой стороны, 5'-H-фосфонат TEDU (Ib) проявлял антивирусную активность в значительно более высоких концентрациях и не влиял на репродукцию резистентного к ацикловиру штамма, а антигерпетическая активность 5'-фторфосфата TEDU (Id) не выявлена в изученном диапазоне концентраций. В то же время все изученные соединения практически не ингибировали репродукцию мутантного ВПГ-1, штамм F(+) (данные не приводятся).

Изученные соединения эффективно снижали инфекционный титр вируса ВПГ-1/L₂ в диапазоне нецитотоксических концентраций. Как следует из рис. 2, снижение инфекционного титра вируса в присутствии TEDU и соединений (Ia) и (Ic) хорошо сравнимо для близких концентраций. Влияние соединения (Ib) выражено заметно слабее.

Таким образом, среди соединений, представленных в настоящем сообщении, два 5'-фосфоната TEDU (Ia) и (Ic), содержащие модифицированные остатки фосфономуравьиной кислоты, обладали низкой цитотоксичностью для культуры

Таблица 6. Цитотоксичность и антивирусный эффект 5'-фосфонатов TEDU (**Ia**)–(**Id**) на штаммах ВПГ-1, чувствительного (ВПГ-1/L₂) и резистентного (ВПГ-1/L₂/R) к ацикловиру, в культуре клеток Vero*

| Соединение | ЦД ₅₀ , мкМ | ВПГ/L ₂ | | | ВПГ/L ₂ /R | | |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|------------------------|------------------------|------|
| | | ИД ₅₀ , мкМ | ИД ₉₅ , мкМ | ИС | ИД ₅₀ , мкМ | ИД ₉₅ , мкМ | ИС |
| TEDU | >1800 | 1.1 | 3.86 | >1650 | 4.7 | 367 | >380 |
| (Ia) | >1200 | 0.7 | 19.6 | >1700 | 24.5 | 235 | >50 |
| (Ib) | >1400 | 29 | 59 | >50 | 566 | 566 | >2.5 |
| (Ic) | >1300 | 1.3 | 5.3 | >1000 | 52.8 | 253 | >25 |
| (Id) | >1300 | 269 | 269 | >5 | 269 | 269 | >5 |
| ACV | >2200 | 1.7 | 3.56 | >1300 | 533 | 889 | >2.5 |
| GCV | >1600 | 1.37 | 2.74 | >1150 | 90 | 180 | >20 |
| BVDU | >900 | 0.15 | 0.6 | >6000 | 151 | 151 | >6 |
| AraA | >190 | 35 | 93.5 | >5 | 46.7 | 140 | >4 |
| PFA | >400 | 52 | 104 | >8 | 78 | 208 | >2 |

* Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл.

ЦД₅₀ – максимальная концентрация соединения, вызывающая гибель не более 50% культивируемых клеток в сравнении с контролем – клетками, инкубируемыми без тестируемого соединения в культуральной среде; ИД₅₀ – концентрация соединения, на 50% ингибирующая развитие ЦПД; ИД₉₅ – концентрация соединения, на 95% ингибирующая развитие ЦПД после 72 ч инкубации; ИС – индекс селективности: отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀.

клеток Vero и высоким селективным антигерпетическим действием, которое распространялось и на штамм ВПГ, резистентный к ацикловиру. Дальнейшее изучение антивирусных свойств и токсичности этих препаратов на лабораторных животных позволит более точно оценить перспективность использования модифицированных 5'-фосфонатов TEDU в качестве антигерпетических средств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

TEDU любезно предоставлен проф. Р.Т. Волкером (Университет Бирмингема, Великобритания), сыворотка крови человека – к.х.н. С.А. Грачевым (ИБХ РАН).

Соединения (**Ia**)–(**Ie**) получали по методикам, описанным в работе [6], и очищали колоночной ионообменной хроматографией на DEAE-Toyorearl (Toyo Soda, Япония) в градиенте концентраций NH₄HCO₃ (0 → 0.15 М). Дополнительную очистку проводили обращенно-фазовой хроматографией на колонке LiChroprep RP-8 (Merck) в градиенте концентраций MeOH в 0.01 М NH₄HCO₃ 0 → 5% для соединения (**Ia**) и 0 → 7% для соединений (**Ib**)–(**Ie**).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Spexord M-40 (Германия) в воде. ЯМР-спектры снимали на спектрометре Bruker WP-200 SY (США) с рабочей частотой 200.13 МГц (внутренний стандарт – трет-бутиловый спирт) для ¹H-ЯМР и 81 МГц (с подавлением спин-спинового фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) для ³¹P-ЯМР.

Масс-спектры в режиме FAB регистрировали на спектрометре Kratos MS-50TS (США) на глицериновой матрице. ТСХ полученных соединений проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах хлороформ–этанол, 9 : 1, или диоксан–25% NH₄OH, 4 : 1.

Изучение стабильности соединения (Ia**).** PBS готовили из 10 × PBS (NaCl – 8.775 г; NaH₂PO₄ × 2H₂O – 0.078 г; Na₂HPO₄ × 2H₂O – 0.8 г на 1 л) разведением в соотношении 1 : 10 и титрованием 11 М HCl до pH 7.4. К 145 мкл PBS прибавляли 5 мкл 30 мМ раствора соединения (**Ia**), инкубировали при 37°C и через 0, 7 и 24 ч отбирали пробы.

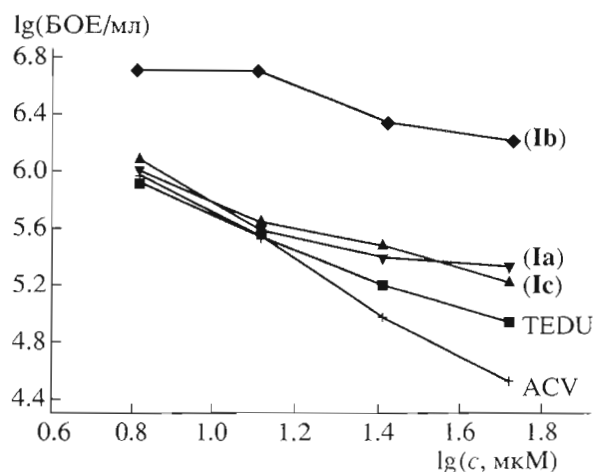


Рис. 2. Влияние TEDU, 5'-фосфонатов TEDU (**Ia**)–(**Ic**) и ACV на инфекционный титр ВПГ/L₂ в культуре клеток Vero.

К 15 мкл пробы прибавляли 45 мкл MeOH, выдерживали 20 мин при -20°C и упаривали пробу на установке Automatic Speed-Vac Concentrator AS260. К полученному сухому осадку прибавляли 10 мкл 5 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 4.8), количественную оценку конверсии вещества (**Ia**) проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson (Франция) с использованием колонки LiChrosorb RP-18 (7 мкм, 4×150 мм) (Merck) (см. табл. 3).

К 145 мкл сыворотки крови человека прибавляли 5 мкл 30 мМ раствора соединения (**Ia**), инкубировали при 37°C и через 0, 3, 7 и 24 ч отбирали пробы. К 15 мкл пробы прибавляли 45 мкл MeOH, выдерживали 20 мин при -20°C , осаждали образовавшийся осадок на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 при 15800 g, отбирали супернатант и упаривали его на установке Automatic Speed-Vac Concentrator AS260. К полученному сухому осадку прибавляли 10 мкл 5 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 4.8), количественную оценку конверсии вещества (**Ia**) проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson (Франция) с использованием колонки LiChrosorb RP-18 (Merck) (7 мкм, 4×150 мм) (табл. 3 и рис. 1а, б).

Поведение TEDU и соединения (Ia**) в культуре клеток Vero.** Эксперимент проводили в двух параллелях. Культуру клеток Vero (3.5 млн. клеток в пробе) инкубировали в присутствии TEDU и соединения (**Ia**) в концентрации 50 мкг/мл. Через 0, 7 и 24 ч инкубацию прекращали, клетки отмывали 5 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.0), суспендировали в 0.5 мл 5 мМ того же буфера, разрушали клетки криолизом, добавляли 1.5 мл EtOH. Образовавшийся осадок отделяли на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 при 15800 g.

Супернатант объемом 2 мл делили на две пробы объемом 1 мл и упаривали их на установке Automatic Speed-Vac Concentrator AS260. Дальнейшую обработку и анализ проводили по описанной выше методике (табл. 4, 5 и рис. 1в).

Эксперименты в клеточных системах. В качестве референс-препаратов использовали ACV (GlaxoWellcom, Великобритания), GCV (Hoffman La Roch Ltd, Швейцария), BVDU (Berlin Chemie AG, Германия), AraA (Calbiochem, США) и PFA (Calbiochem, США).

Монослой клеток Vero, полученных из лаборатории культуры тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, выращивали в среде Игла, содержащей 7% телячьей эмбриональной сыворотки, L-глутамин и антибиотики.

Штамм ВПГ-1/L₂ получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Вирус пассировали при 37°C в культуре клеток Vero в среде, состоящей из равных частей сред Игла и 199, содержащей

2% эмбриональной сыворотки телят (среда поддержки).

Мутантный штамм ВПГ-1/L₂/R, резистентный к ацикловиру, получали путем проведения серийных пассажей в клетках Vero при низкой множественности инфицирования (приблизительно 0.1 БОЕ/кл.) в присутствии возрастающих концентраций ACV по методу [20]. ВПГ-1, штамм F(+), резистентный к комбинации ACV и PFA, любезно предоставлен Р.А. Гибадулиным (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН). Титрование вируса проводили стандартным методом [19, 21].

Анализ подавления развития вирус-индуцированного ЦПД проводили в 96-луночных пластиковых планшетах (Linbro, Flow Lab, Великобритания) с использованием серийных двукратных разведений исследуемых соединений в среде поддержки (три лунки на каждое разведение) [17, 18, 20]. Монослойные культуры клеток Vero инфицировали с множественностью 0.1 БОЕ/кл. ЦПД оценивали через 72 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Анализ противовирусного действия препаратов методом снижения инфекционного титра вируса выполняли в соответствии с [19].

Определение ЦД₅₀ проводили в неинфицированных культурах клеток Vero в 96-луночных пластиковых планшетах с использованием метода окрашивания трипановым синим [17, 22].

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-04-48627).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krayevsky A.A., Watanabe K. Modiefed Nucleotides as Anti-AIDS Drugs: Current Status and Perspectives. Moscow: Bioinform, 1993. P. 98–125.
2. Jonns R.J., Bischofberger N. // Antiviral Res. 1995. V. 27. P. 1–17.
3. Lambert R.W., Martin J.A., Thomas J., Duncan I.B., Hall M.J., Heimer E.P. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 367–374.
4. Griengl H., Hayden W., Penn G., DeClerq E., Rosenwirth B. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. P. 1831–1839.
5. Vaghefi M.M., McKernen P.A., Robins R.K. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. P. 1389–1393.
6. Jasko M., Shipitsin A., Shirokova E., Krayevsky A., Polsky B., Baron P., MacLow C., Ostrander M., O'Hara B. // Nucleosides Nucleotides. 1993. V. 12. P. 879–893.
7. Dyson M.R., Coe P.L., Walker R.T. // J. Med. Chem. 1991. V. 34. P. 2782–2786.
8. Secrist III J.A., Tiwari K.N., Riordan J.M., Montgomery J.A. // J. Med. Chem. 1991. V. 34. P. 2361–2366.
9. van Draanen N.A., Freeman G.A., Harvey R., Jansen R., Szczech G., Koszalka G.W. // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 538–542.
10. Raum S.G., Trivedi N., Bogunovic-Batchelor M.V., Hardy G.W., Mills G., Selway J.W.T., Littler E., Coe P.L.,

- Basnak I., Whale R.F., Walker R.T.* // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 789–795.
11. *Basnak I., Otter G.P., Duncombe R.J., Westwood N.B., Pietrarelli M., Hardy G.W., Mills G., Rahim S.G., Walker R.T.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1998. V. 17. P. 879–893.
 12. *Elzagheid M.J., Onianen M., Walker R.T., Secrist III J.A.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 181–186.
 13. *Fu Y.-L., Bobeck M.* // *Nucl. Acid Chemistry / Eds L. Tounsend, R.S. Tipson.* New York: John Willey and Sons, 1978. P. 317–323.
 14. *Walker R.T., Whale R.F., Dyson M.R., Coe P.L., Alderton W., Collins P., Ertl P., Lowe D., Snowden W., Litterer E.* // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 20. P. 783–789.
 15. *Verri A., Focher F., Duncombe R.J., Basnak I., Walker R.T., Coe P.L., De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Spadari S.* // *Biochem. J.* 2000. V. 351. P. 319–326.
 16. *Alexandrova L.A., Semizarov D.G., Krayevsky A.A., Walker R.T.* // *Antiviral Chem. and Chemother.* 1996. V. 7. P. 237–242.
 17. *De Clercq E., Descamps J., Verhelst G., Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D.* // *J. Infect. Dis.* 1980. V. 141. P. 563–574.
 18. *Fedorov I.I., Kazmina E.M., Gurskaya G.V., Jasko M.V., Zavadnic V.E., Balzarini J., De Clercq E.* // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 486–494.
 19. *Cheng Y.-C., Huang E.-S., Mar E.-C., Pagano J.S., Dutschman C.E., Crill S.P.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 2767–2770.
 20. *Галегов Г.А., Шобухов В.М., Леонтьева Н.А., Ясько М.В.* // *Биоорганич. химия.* 1997. Т. 23. С. 906–909.
 21. *Collins P., Bauer D.J.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1977. V. 284. P. 49–59.
 22. *Holy A., De Clercq E., Votruba I.* // *Phosphonylmethyl Esters of Nucleosides and Their Acyclic Analogues / Ed. J.C. Martin.* Washington, 1989. P. 50–71.

4'-Thio-5-Ethyl-2'-Deoxyuridine 5'-Phosphonates: Synthesis and Antiviral Activity

L. A. Aleksandrova[#], V. L. Andronova^{**}, I. L. Karpenko^{*},
Yu. S. Skoblov^{*}, A. Adani^{*}, and G. A. Galegov^{**}

[#] Phone: +7 (095) 135-6065; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: chernov@imb.imb.ac.ru

^{*} Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 119991 Russia

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

A number of new 5'-phosphonate derivatives of 4'-thio-5-ethyl-2'-deoxyuridine (TEDU) were synthesized. These compounds displayed a low cytotoxicity and, except for TEDU 5'-fluorophosphate, antiherpes activity similar to that of 9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine (acyclovir) and 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine (penciclovir). 5'-Ethoxycarbonylphosphonate and 5'-aminocarbonylphosphonate of TEDU were also found to suppress the reproduction of herpes simplex type 1 virus, which is resistant to acyclovir. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antiviral preparations, herpes simplex virus, nucleoside phosphonates