



УДК 577.113.3.017

## СИНТЕЗ И АНТИГЕРПЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФОНАТНЫХ ЭФИРОВ АЦИКЛОВИРА

© 2004 г. М. В. Ясько\*, Н. Ю. Уланова\*, В. Л. Андропова\*\*, А. В. Иванов\*,  
И. Л. Карпенко\*, М. К. Куханова\*, Г. А. Галегов\*\*, Ю. С. Скоблов\*\*

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

\*\*Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

Поступила в редакцию 03.11.2003 г. Принята к печати 23.12.2003 г.

Синтезированы алкильные эфиры фосфита, алкоксикарбонилфосфоната, этоксикарбонилметилфосфоната и аминокарбонилфосфоната ацикловира. Показано, что большинство из них способны подавлять репродукцию вируса герпеса простого типа 1 в культуре клеток Vero. Исследована стабильность нескольких производных в фосфатном буфере и в сыворотке крови человека. Обсуждается корреляция между стабильностью синтезированных соединений и их антивирусными свойствами.

*Ключевые слова:* вирус герпеса простого; ацикловир, фосфонаты.

### ВВЕДЕНИЕ

Ацикловир (АСВ, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин) – один из самых распространенных и хорошо изученных противогерпесных препаратов. Механизм его действия основан на последовательном ферментативном фосфорилировании АСВ сначала вирусной, а затем клеточными киназами до трифосфата, который встраивается во вновь синтезируемую цепь ДНК ДНК-полимеразой вируса герпеса и терминирует элонгацию вирусной ДНК [1]. Многочисленные попытки повысить эффективность АСВ с помощью химических модификаций, облегчающих его проникновение в клетку, позволили получить более эффективный препарат валацикловир, обладающий более высокой биодоступностью [2].

Одним из подходов к повышению антивирусных свойств исходного нуклеозидного аналога является синтез менее токсичных производных, которые легче проникают в клетки и там эффективно превращаются в целевое вещество, подавляющее размножение вируса. Такое соединение должно обладать большим индексом селективности, что может быть достигнуто как за счет повышения антивирусной активности, так и за счет снижения

токсичности. Стратегия оказалась достаточно продуктивной для 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина – широко известных анти-ВИЧ-препаратов. Так, некоторые фосфонатные производные этих соединений обладали более высокой антивирусной активностью и пониженной токсичностью [3, 4].

Ранее было показано, что фосфит АСВ в культуре клеток Vero обладал антигерпетической активностью, в том числе и в отношении штамма, резистентного к действию АСВ [5], поэтому можно предполагать, что фосфонатные производные АСВ также проявят антивирусную активность.

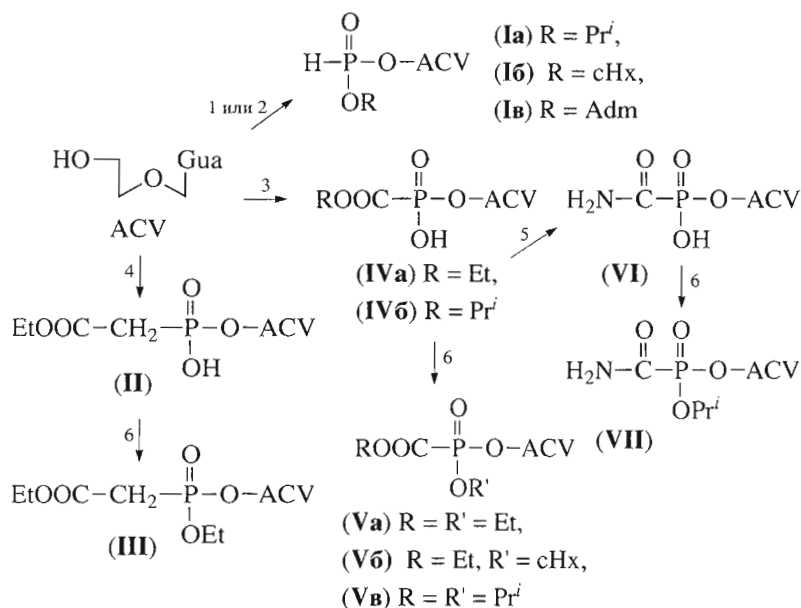
Цель настоящей работы – синтез фосфонатных производных АСВ, обладающих способностью подавлять размножение вируса герпеса простого с эффективностью более высокой, чем АСВ. Ранее мы сообщали о синтезе и некоторых свойствах нескольких фосфонатных производных АСВ, обладающих антигерпетической активностью [6]. В данной работе число синтезированных новых фосфонатов АСВ значительно расширено.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основная идея в выборе производных АСВ, обладающих антигерпетической активностью, заключалась в синтезе соединений, которые могли бы легко проникать в клетки и достаточно быстро превращаться в АСВ, который и обладает антивирусным действием. Таким образом, представлялся перспективным поиск соединений – производных АСВ, которые были бы более эффективными, чем исходный АСВ, за счет более

Сокращения: АСВ – ацикловир, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин; Adm – 1-адамантил; сНх – циклогексил; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодимид; TPS-Cl – 2,4,6-триизопротилбензолсульфонилхлорид; HSV-1/L<sub>2</sub>/R – вирус герпеса простого, тип 1; ИД<sub>50</sub> и ИД<sub>95</sub> – дозы, ингибирующие вирусное цитопатогенное действие на 50 и 95%; ЦТД<sub>50</sub> – 50%-ная цитотоксическая доза для незараженных клеток Vero; ИС – индекс селективности (отношение ЦТД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>).

\*Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: skoblov@eimb.ru).



Реагенты: 1 –  $\text{Pr}^i\text{OPCl}_2$  (для (Ia)); 2 –  $\text{H}_3\text{PO}_3$ , пивалоилхлорид, ROH; 3 –  $\text{ROOCP}(\text{O})(\text{OH})_2$ , пивалоилхлорид; 4 –  $\text{EtOOCCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ , DCC; 5 –  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; 6 – ROH, TPS-Cl.

#### Схема.

высокой антивирусной активности и, по возможности, более низкой токсичности. Поэтому все представленные в этой работе препараты тестировались на способность подавлять цитопатогенное действие вируса герпеса и на токсичность для неинфицированных клеток Vero. Для соединений, показавшихся наиболее интересными или важными для понимания предполагаемого механизма действия, была определена антивирусная активность на штаммах вируса герпеса простого, в разной степени резистентного к действию ACV. Кроме того, мы исследовали гидролиз таких соединений в фосфатном буфере и в нормальной сыворотке крови человека для определения их стабильности и возможных продуктов метаболизма.

На схеме представлены синтезы следующих производных ACV, замещенных по гидроксигруппе: эфиров фосфита (Ia)–(Iв), этоксикарбонилметилфосфоната (III), этоксикарбонилфосфоната и изопророксикарбонилфосфоната (Va)–(Vв), а также аминокарбонилфосфоната (VII).

Ранее мы синтезировали соединение (Ia) с выходом 56% конденсацией фосфита ACV (VIII) (полученному по методу [5]) с изопроропанолом [6]. В данной работе синтез эфиров фосфита (Ia)–(Iв) осуществляли конденсацией ACV с фосфористой кислотой в присутствии пивалоилхлорида с последующим взаимодействием с соответствующим спиртом без выделения промежуточного фосфита (VIII). Выход реакции зависел от реакционной способности соответствующего спирта и составил для эфиров (Ia), (Iб) и (Iв) – 61, 56 и 30% соот-

ветственно. Фосфонилирование ACV изопроропилдихлорфосфитом в триэтилфосфате аналогично методу [7] позволило получить целевой продукт (Ia) с выходом лишь 14%.

Общая схема синтеза целевых триэфиров (III), (Va)–(Vв) и амидоэфира (VII) включает получение анионных фосфонатов (II), (IVa), (IVб) и (VI) и последующую их этерификацию.

Изопророксикарбонилфосфоновая кислота была получена переэтерификацией триметилфосфоноформиата с последующим удалением сложноэфирных групп при атоме фосфора под действием триметилбромсилана. Фосфоноформиат (IVб) синтезировали аналогично ранее полученному этоксикарбонилфосфонату (IVa) [6] путем конденсации ACV и изопророксикарбонилфосфоновой кислоты в присутствии пивалоилхлорида. Для синтеза фосфоноацетата (II) такой метод оказался малоэффективным, поэтому в качестве конденсирующего агента использовали DCC. Аминирование фосфоната (IVa) водным аммиаком приводило к соответствующему амиду (VI). Этерификацию анионных фосфонатов (II), (IVa), (IVб) и (VI) осуществляли реакцией с соответствующими спиртами в присутствии TPS-Cl. Выходы составляли 32–71%.

Анионные фосфонаты (II), (IVa), (IVб) и (VI) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl. При синтезе эфиров (Ia)–(Iв), (III) и (VII) для удаления из реакционных смесей продуктов гидролиза пивалоилхлорида и TPS-Cl использовали фильтрацию через DEAE-целлю-

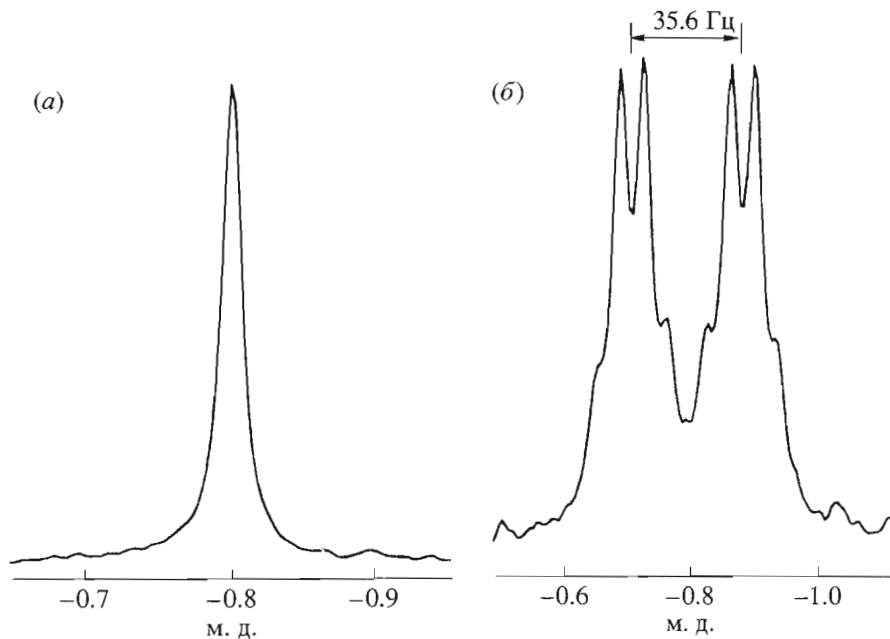
**Таблица 1.** Действие фосфонатов ACV на репродукцию HSV-1/L<sub>2</sub> в культуре клеток Vero

Соединение	Шифр	ЦТД <sub>50</sub> , мкМ	HSV-1/L <sub>2</sub>		
			ИД <sub>50</sub> , мкМ	ИД <sub>95</sub> , мкМ	ИС
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHO} \end{array}$	(Ia)	>3021	0.45	1.89	>6713
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{OсHx} \end{array}$	(Iб)	>2693	2.61	10.5	>1032
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{Adm}-\text{O} \end{array}$	(Iв)	1417	2.95	—*	480
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	(III)	682	85.5	—*	8
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{OOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	(IVa)	>2646	330.7	661	>8
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{OOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	(Va)	>2570	4.0	8.0	>321
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{OOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{OсHx} \end{array}$	(Vб)	2030	12.6	—*	161
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHOOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHO} \end{array}$	(Vв)	>2396	8.6	—*	>279
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{OOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHO} \end{array}$	(Vг)	>2481	0.37	0.77	>6705
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHO} \end{array}$	(VII)	>1336	2.59	5.2	>668
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	(VIII)	3922	20.4	81.7	192
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HOOC}-\text{P}-\text{O}-\text{ACV} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	(IX)	>2857	35.7	71.4	>80
ACV		>2226	1.82	2.27	>1223

\* Величина ИД<sub>95</sub> для этих соединений не определялась.

лозу в ацетатной форме. Очистку эфиров (Ia)–(Iв), (III) и (Va)–(Vв) осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле. В ряде случаев

выделение проводили с использованием обращенно-фазовых силикагелей LiChroprep RP-8 и RP-18.



**Рис. 1.**  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры ( $\text{DMSO}-d_6$ ) амида (VII): (а) – с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, (б) – без подавления фосфор-протонного взаимодействия.

Структура синтезированных соединений подтверждена данными  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии (см. “Эксперимент. часть”).

Следует отметить, что в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре ( $\text{DMSO}-d_6$ ) протоны амидной группы соединения (VII) наблюдаются в виде двух групп сигналов – синглета при 8.13 м. д. и дублета с константой  $^3J \cong \cong 35$  Гц при 8.17 м. д. (см. “Эксперимент. часть”).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр подтвердил гипотезу о взаимодействии атома фосфора с одним из протонов амидной группы с  $^3J_{\text{P,H}} = 35.6$  Гц (рис. 1). Сходная картина наблюдалась нами ранее для аминокарбонилфосфоната 3'-азидо-3'-дезокситимидина [4]. Аналогичная константа в случае амида (VI) составила 26.5 Гц.

Согласно данным табл. 1, большинство синтезированных производных ACV (за исключением (Iв),

(III) и (VII)) малотоксичны для культуры клеток Vero, при этом их токсичность слабо коррелирует с природой алкильных радикалов в эфирах (Iа)–(Iв) или (Va)–(Vг). Фосфоноацетатный эфир (III) помимо выраженной токсичности был значительно менее активен, чем ACV. Фосфонаты (Iа)–(Iв), (Va)–(Vг) и (VII) проявили способность подавлять развитие вируса герпеса, в то же время антивирусная активность анионных фосфонатов (IVа) и (IX) была низкой [6]. Представляется, что колебания величины  $\text{ID}_{50}$  для соединений (Iа)–(Iв), (Va)–(Vг) и (VII) определяются как эффективностью проникновения веществ в клетки, так и легкостью образования из них ACV.

Вероятно, для фосфонатов (IVа) и (IX) [6], а также (III) низкая антивирусная активность в большей степени связана с их чрезвычайно высокой стабильностью и соответственно низкой скоростью высвобождения ACV в клетках. В табл. 2 приведены данные по стабильности некоторых синтезированных нами производных ACV в фосфатном буфере и в нормальной сыворотке крови человека. Примечательно, что если время гидролиза соединений (Iа), (Vв) и (Vг) в сыворотке крови измеряется минутами, то фосфонаты (III), (IVа) и (IX) гидролизуются в тех же условиях примерно на 2–3 порядка медленнее.

Следует отметить, что соединения, обладающие высокой стабильностью в сыворотке крови, имеют низкую антивирусную активность. Высокая антивирусная активность соединений (Iа) и (Vг) соответствует их высокой скорости гидролиза до ACV, что показал анализ ВЭЖХ (см. табл. 2).

**Таблица 2.** Стабильность исследуемых соединений в фосфатно-солевом буфере и в сыворотке крови человека

Соединение	PBS		Сыворотка крови человека	
	Время инкубации	Содерж., %	Время инкубации	Содерж., %
(Iа)	30 мин	56	5 мин	27
(III)	72 ч	73	21 ч	44
(IVа)	72 ч	84	72 ч	38
(Vв)	45 мин	55	10 мин	35
(Vг)	45 мин	54	10 мин	35
(VIII)	72 ч	98	72 ч	82
(IX)	72 ч	~100	72 ч	~100

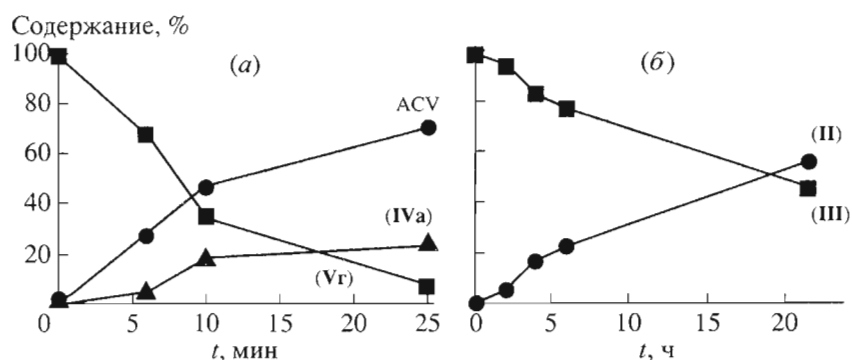


Рис. 2. Анализ продуктов гидролиза фосфонатов в сыворотке крови человека: а – соединения (Vr); б – соединения (III).

В то же время неясно, почему соединение (Vb), сравнительно легко гидролизующееся и в буфере, и в сыворотке, проявляет антивирусную активность в 3–4 раза более низкую, чем ACV. Хотя соединение (Vr) гидролизуется ферментами сыворотки крови с образованием двух альтернативных продуктов: ACV и фосфоната (IVa) (рис. 2а), основной продукт гидролиза – ACV – накапливается быстро, чем и можно объяснить высокую антивирусную активность (Vr). Низкая антивирусная активность фосфоноацетата (III) может объясняться тем, что продуктом его гидролиза является не ACV, а анионный фосфонат (II), причем гидролиз в сыворотке крови проходит со скоростью примерно в 100 раз меньшей, чем соединения (Vr) (рис. 2б). Эти данные хорошо согласуются с данными по анти-ВИЧ-активности фосфонатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина [4]. Следует подчеркнуть, что соединения (Ia) и (Vr) по индексу селективности в несколько раз превосходят исходный ACV при испытаниях на штамме HSV-1/L<sub>2</sub> и подтверждают перспективность выбранного направления модификации ACV. Впрочем, такой подход не гарантирует успеха. Например, фосфонатные производные 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов и 4'-тио-5-этил-2'-дезоксинуридина обладали более низкой способностью подавлять репродукцию вируса герпеса, чем исходные нуклеозиды [8, 9].

Интересными оказались результаты тестирования этих соединений на штаммах HSV, резистентных к ACV (табл. 3). Резистентный штамм вируса HSV-1/L<sub>2</sub>/R был практически одинаково устойчив к действию как ACV, так и соединений

(Ia) и (Vr). Вместе с тем, на частично резистентный к действию ACV клинический изолят вируса HSV-1 (Avd) соединения (Ia) и (Vr) действуют эффективнее, чем исходный ACV, примерно в 5–10 раз, а по ИД<sub>95</sub> превосходят ACV в 30 раз.

В то же время подтвердилось сообщение [5], что фосфит ACV (VIII) достаточно эффективно подавляет развитие резистентного штамма HSV-1/L<sub>2</sub>/R. Частично резистентный к действию ACV клинический изолят вируса HSV-1 (Avd) и эталонный штамм HSV-1/L<sub>2</sub> подавлялись фосфитом (VIII) с одинаковой эффективностью. С учетом высокой стабильности этого производного (табл. 2) и его сравнительно низкой антивирусной активности на эталонном штамме HSV-1/L<sub>2</sub> (табл. 1) действие соединения (VIII) на резистентный к ACV штамм HSV-1/L<sub>2</sub>/R неясно.

Таким образом, полученные результаты показывают, что предложенные нами фосфонатные модификации позволили создать несколько производных ACV – ингибиторов репродукции вируса герпеса – более эффективных в культуре клеток Vero, чем исходный нуклеозид. Дальнейшие испытания на лабораторных животных наиболее интересных соединений покажут реальную перспективность этих препаратов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали DEAE-Toyopearl (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма) (Toyosoda); DEAE-целлюлозу DE-32 (AcO<sup>-</sup>-форма) (Whatman); TPS-Cl (Aldrich); триэтилфосфо-

Таблица 3. Действие некоторых фосфонатов ACV на репродукцию резистентных штаммов HSV-1 в культуре клеток Vero

Соединение	ЦТД <sub>50</sub> , мкМ	HSV-1/L <sub>2</sub> /R			HSV-1 (Avd)		
		ИД <sub>50</sub> , мкМ	ИД <sub>95</sub> , мкМ	ИС	ИД <sub>50</sub> , мкМ	ИД <sub>95</sub> , мкМ	ИС
(Ia)	>3021	181	>363	>16.7	1.9	3.8	>1590
(Vr)	>2481	149	>298	>16.7	0.77	3.1	>3222
(VIII)	3922	40.8	327	96	20.4	81.7	192
ACV	>2226	486	>486	>4.6	6.3	101	353

ноформиат, триэтилфосфоацетат и пивалоилхлорид (Fluka); 32% водный аммиак, Kieselgel 60 (63–100 мкм), LiChroprep RP-8 (25–40 мкм) и LiChroprep RP-18 (25–40 мкм) (Merck). ACV был предоставлен компанией “Ассоциация АЗТ” (Москва). Изопропилдихлорфосфит синтезировали в соответствии с работой [7]. Фосфит (VIII) был синтезирован по методу [5], фосфоноформиаты (IVa), (Vr) и (IX) по методу [6].

ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для  $^1\text{H}$ -ЯМР (внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$  для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия для  $\text{D}_2\text{O}$ ), 162 МГц для  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (с подавлением фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) и 100 МГц для  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (с подавлением углерод-протонного взаимодействия, внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$ ); УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC.

Количественную оценку продуктов гидролиза соединений проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson (Франция) с использованием колонок LiChrosorb RP-18 (Merck, размер частиц 7 мкм,  $4 \times 150$  мм) в градиенте метанола в 5 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 4.8); градиент А: 0% – 5 мин, 0 → 7% – 5 мин, 7 → 17% – 25 мин и 17 → 66% – 5 мин; градиент Б: 0% – 5 мин, 0 → 7% – 5 мин, 7 → 17% – 25 мин, 17 → 53% – 5 мин, 53 → 66% – 5 мин и 66% в течение 5 мин; скорость элюции 0.4 мл/мин; детекция при 254 нм.

**О-Изопропилфосфит ацикловира (Ia). Метод А.** Суспензию ACV (100 мг, 0.44 ммоль) в триэтилфосфате (2 мл) охлаждали до 8°C, добавляли изопропилдихлорфосфит (100 мкл, 0.73 ммоль), выдерживали 18 ч. Реакционную смесь разбавляли 50% водным пиридином (2 мл), раствор упаривали, остаток растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и наносили на колонку ( $1.8 \times 18$  см) с силикагелем, элюировали в линейном градиенте концентрации  $\text{EtOH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0 → 15%). Фракции, содержащие продукт (Ia), упаривали, остаток растворяли в воде (1 мл) и наносили на колонку с LiChroprep RP-8 ( $2 \times 20$  см), элюировали в линейном градиенте  $\text{MeOH}$  в воде (0 → 20%, объем 0.4 л). Целевые фракции упаривали и лиофилизировали из воды. Выход 21 мг (14%).  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры соответствовали таковым, описанным в работе [6].  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 156.7 (с, C6), 153.9 (с, C2), 151.3 (с, C4), 137.5 (с, C8), 116.5 (с, C5), 71.8 (с,  $\text{CH}_2\text{-Gua}$ ), 70.2 (д,  $^2J_{\text{C,P}}$  5.3,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 67.7 (д,  $^2J_{\text{C,P}}$  6.1,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 63.9 (д,  $^3J_{\text{C,P}}$  5.3,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 23.4, 23.5 (два д,  $^3J_{\text{C,P}}$  4.5,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

**Метод Б.** К охлажденной до 8°C суспензии ACV (110 мг, 0.49 ммоль) и фосфористой кислоты (150 мг, 1.83 ммоль) в смеси DMF–пиридин (1 : 1, 20 мл) приливали пивалоилхлорид (300 мкл, 2.44 ммоль). Смесь перемешивали 18 ч, добавля-

ли изопропанол (400 мкл, 5.22 ммоль) и пивалоилхлорид (400 мкл, 3.25 ммоль), перемешивали раствор 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и фильтровали через колонку ( $3 \times 9$  см) с DEAE-целлюлозой, промывали колонку 50% водным этанолом (300 мл). Поглощающие в УФ фракции упаривали, остаток упаривали с толуолом ( $2 \times 5$  мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем ( $2 \times 24$  см). Элюировали в градиенте концентрации  $\text{MeOH}$  в  $\text{CHCl}_3$  (0 → 15%). Выход 98.7 мг (61%).

**О-Циклогексилфосфит ацикловира (Iб)** получали аналогично описанному для фосфита (Ia) по методу Б с использованием циклогексанола с выходом 56%.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 10.71 (1 H, с, NH), 7.82 (1 H, с, H8), 6.82 (1 H, д,  $J_{\text{H,P}}$  699, H-P), 6.65 (2 H, с,  $\text{NH}_2$ ), 5.37 (2 H, с,  $\text{CH}_2\text{-Gua}$ ), 4.29 (1 H, м,  $\text{CH}(\text{сНх})$ ), 4.06 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 3.66 (2 H, т,  $J$  4.4,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}$ ), 1.79, 1.62, 1.43, 1.26 (10 H, 4 м, 5  $\text{CH}_2$  (сНх)).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 8.26 (с).

**О-(1-Адамантил)фосфит ацикловира (Iв)** получали аналогично фосфиту (Ia) по методу Б с использованием 1-адамантанола с выходом 30%.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 10.62 (1 H, с, NH), 7.82 (1 H, с, H8), 6.85 (1 H, д,  $J_{\text{H,P}}$  695, H-P), 6.49 (2 H, с,  $\text{NH}_2$ ), 5.37 (2 H, с,  $\text{CH}_2\text{-Gua}$ ), 4.02 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 3.67 (2 H, дд,  $J$  4.4, 4.7,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}$ ), 2.10 (3 H, уш.с, 3CH (Adm)), 1.94, 1.56 (12 H, 2 м, 6  $\text{CH}_2$  (Adm)).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 3.43 (с).

**Этоксикарбонилметилфосфонат ацикловира, аммониевая соль (II).** К триэтилфосфоацетату (0.5 мл, 2.86 ммоль) прибавляли триметилбромсилан (1.5 мл, 11.4 ммоль) и раствор выдерживали при комнатной температуре 18 ч. Реакционную смесь упаривали, остаток упаривали с толуолом ( $2 \times 5$  мл), разбавляли водным пиридином (1 : 1, 4 мл) и через 30 мин упаривали. Остаток упаривали с пиридином (10 мл), растворяли в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 30 мл), добавляли ACV (100 мг, 0.44 ммоль) и DCC (725 мг, 3.5 ммоль). Смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли водой (30 мл), через 30 мин фильтровали, фильтрат наносили на колонку ( $2.6 \times 21$  см) с DEAE-Toyopearl ( $\text{HCO}_3^-$ ), промывали колонку водой (300 мл) и элюировали в линейном градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0 → 0.1 М, объем 1 л). Фракции, поглощающие в УФ, упаривали. Выход 167 мг (76%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.91 (1 H, с, H8), 5.48 (2 H, с,  $\text{CH}_2\text{-Gua}$ ), 4.03 (2 H, кв,  $J$  7.2,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.95 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 3.71 (2 H, дд,  $J$  4.4, 4.7,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}$ ), 2.75 (2 H, д,  $J$  20.6,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 1.13 (3 H, т,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 15.39 (с).

**Этил(этоксикарбонилметил)фосфонат ацикловира (III).** К раствору фосфоната (II) (126 мг, 0.34 ммоль) в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 30 мл) добавляли  $\text{EtOH}$  (800 мкл), охлаждали до 8°C и добавляли с интервалом в 18 ч TPS-Cl ( $2 \times 303$  мг,



2 ммоль), выдерживали при 8°C при постоянном перемешивании 36 ч. Реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и фильтровали через колонку с DEAE-целлюлозой (3 × 9 см), промывали 50% водным этанолом (300 мл). Поглощающие в УФ фракции упаривали, остаток упаривали с водой (2 × 5 мл), толуолом (2 × 5 мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем (2 × 24 см), элюируя в линейном градиенте концентрации MeOH в CHCl<sub>3</sub> (5 → 10%). Целевые фракции упаривали и лиофилизировали из воды. Выход 43 мг (32%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.57 (1 H, с, NH), 7.81 (1 H, с, H8), 6.47 (2 H, с, NH<sub>2</sub>), 5.37 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 3.97–4.10 (6 H, м, CH<sub>2</sub>OP, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67 (2 H, дд, *J* 4.4, 4.7, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC), 3.08 (2 H, д, *J* 21.5, CH<sub>2</sub>P), 1.15–1.20 (6 H, м, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 21.25 (с).

**Изопропоксикарбонилфосфоновая кислота, аммониевая соль.** К охлажденному до 0°C раствору триметилфосфоноформата (0.5 мл, 3.7 ммоль) в 10 мл изопропанола прибавляли 80% суспензию NaN в масле (22 мг, 0.7 ммоль), выдерживали 3 сут при 20°C. К реакционной смеси добавляли AcOH (40 мкл, 0.7 ммоль), раствор упаривали в вакууме, остаток упаривали с толуолом (3 × 10 мл) и прибавляли триметилбромсилан (1.5 мл, 11.1 ммоль). Через 18 ч раствор упаривали, остаток упаривали с толуолом (3 × 10 мл), прибавляли 1% водный аммиак (5 мл) и упаривали. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и наносили на колонку с DEAE-Toyopearl (2.6 × 21 см), промывали колонку водой (200 мл) и элюировали в линейном градиенте концентрации NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0 → 0.15 M, объем 1 л). Фракции, поглощающие в УФ, концентрировали, упаривали с водой, остаток дополнительно очищали на колонке с LiChroprep RP-18 (2 × 20 см), элюировали водой. Выход 120 мг (17%). УФ (H<sub>2</sub>O, pH 7): λ<sub>max</sub> 238.5 нм. <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 4.89 (1 H, гептет, *J* 6.2, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.10 (6 H, д, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): -4.00 (с).

**Изопропоксикарбонилфосфонат ацикловира, аммониевая соль (IVб).** Аммониевую соль изопропоксикарбонилфосфоновой кислоты (110 мг, 0.59 ммоль) соупаривали с пиридином (10 мл), растворяли в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 40 мл) и добавляли ACV (120 мг, 0.53 ммоль). Полученную суспензию охлаждали до 0°C, приливали пивалоилхлорид (100 мкл, 0.81 ммоль), перемешивали 18 ч при 8°C. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл), хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl (2.6 × 21 см), промывали колонку водой (200 мл) и элюировали в линейном градиенте концентрации NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0 → 0.15 M, объем 1 л). Поглощающие в УФ фракции концентрировали, упаривали с водой, остаток дополнительно очищали на колонке с LiChroprep RP-8 (2 × 20 см), элюировали водой. Фракции, содержащие фосфонат (IVб), высушивали лиофилизацией. Выход 150 мг (75%). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.80 (1 H, с, H8), 5.39 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 4.90 (1 H, м, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.95 (2 H,

м, CH<sub>2</sub>OP), 3.64 (2 H, дд, *J* 4.4, 4.7, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.08 (6 H, д, *J* 6.5, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): -4.14 (с).

**Этил(этоксикарбонил)фосфонат ацикловира (Va).** К охлажденному до 8°C раствору этоксикарбонилфосфоната (IVa) (105 мг, 0.29 ммоль) и этанола (0.5 мл) в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 40 мл) двумя порциями с интервалом в 6 ч добавляли TPS-Cl (2 × 264 мг, 1.74 ммоль), смесь выдерживали при 8°C и постоянном перемешивании 18 ч. Выделяли аналогично выделению эфира (III). Выход 55 мг (49%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 7.86 (1 H, с, H8), 5.49 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 4.32 (4 H, м, CH<sub>2</sub>OP, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.23 (2 H, д.кв, *J* 7.2, POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.83 (2 H, дд, *J* 3.7, 4.7, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC), 1.30–1.36 (6 H, м, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): -3.87 (с).

**Циклогексил(этоксикарбонил)фосфонат ацикловира (Vб)** получали конденсацией этоксикарбонилфосфоната (IVa) с циклогексанолом аналогично синтезу эфира (Va) с выходом 62%. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.60 (1 H, с, NH), 7.80 (1 H, с, H8), 6.48 (2 H, с, NH<sub>2</sub>), 5.36 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 4.45 (1 H, м, CH(cHx)), 4.18–4.28 (4 H, м, CH<sub>2</sub>OP, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69 (2 H, дд, *J* 3.8, 4.4, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC), 1.81, 1.63, 1.47, 1.25 (13 H, 4 м, 5CH<sub>2</sub> (cHx) + CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): -5.07 (с).

**Изопропил(изопропоксикарбонил)фосфонат ацикловира (Vв).** Раствор изопропоксикарбонилфосфоната (IVб) (145 мг, 0.39 ммоль) и изопропанола (0.5 мл) в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 40 мл) охлаждали до 8°C, прибавляли TPS-Cl (250 мг, 0.83 ммоль) и перемешивали 18 ч при 8°C. Реакционную смесь разбавляли водой (10 мл), упаривали, соупаривали с толуолом (3 × 10 мл), растворяли в смеси CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1) и наносили на колонку с силикагелем (2.5 × 25 см), продукт элюировали 7% MeOH в CHCl<sub>3</sub>. Выход 75 мг (46%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 7.85 (1 H, с, H8), 5.49 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 5.16 (1 H, с, CO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 5.16 (1 H, м, POCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.31 (2 H, м, CH<sub>2</sub>OP), 3.84 (2 H, уш.с, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.34, 1.29 (12 H, 2 д, *J* 6.2, 2 CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): -4.81(с).

**Аминокрбонилфосфонат ацикловира, аммониевая соль (VI).** Раствор этоксикарбонилфосфоната (IVa) (209 мг, 0.58 ммоль) в 32% водном аммиаке (10 мл) выдерживали 36 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в воде (1 мл) и наносили на колонку с DEAE-Toyopearl (2.6 × 21 см), элюировали в линейном градиенте концентрации NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0 → 0.1 M, объем 1 л). Поглощающие в УФ фракции упаривали и наносили на колонку с LiChroprep RP-18 (2 × 20 см), элюировали водой (400 мл). Выход 79 мг (41%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.73 (1 H, с, NH), 7.82 (1 H, с, H8), 7.10 (~6 H, м, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>CP), 6.57 (2 H, уш.с, NH<sub>2</sub>), 5.35 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 3.82 (2 H, м, CH<sub>2</sub>OP), 3.44 (2 H, м, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O). <sup>31</sup>P-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): -3.07 (с).

**Изопропил(аминокарбонил)фосфонат ацикловира (VII).** К охлажденному до 8°C раствору аминокарбонилфосфоната (VI) и изопропанола (1 мл) в смеси DMF и пиридина (1 : 1, 40 мл) двумя порциями с интервалом в 6 ч добавляли TPS-Cl (2 × 217 мг, 1.43 ммоль), выдерживали при 8°C 18 ч при постоянном перемешивании. Реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (3 × 9 см), промывали водой (300 мл). Поглощающие в УФ фракции упаривали и наносили на колонку с LiChroprep RP-8 (2 × 20 см), продукт элюировали в линейном градиенте MeOH в воде (0 → 30%, объем 0.5 л). Фракции, содержащие целевой фосфонат (VII), упаривали. Выход 63 мг (71%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 10.65 (1 H, с, NH), 8.17 (1 H, д, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> ~ 35, H<sub>a</sub> (NH<sub>2</sub>CP)), 8.13 (1 H, уш.с, H<sub>b</sub> (NH<sub>2</sub>CP)), 7.82 (1 H, с, H8), 6.52 (2 H, уш.с, 2-NH<sub>2</sub>), 5.36 (2 H, с, CH<sub>2</sub>-Gua), 4.61 (1 H, м, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.12 (2 H, м, CH<sub>2</sub>OP), 3.67 (2 H, т, J 4.4, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.24 (6 H, д, J 5.9, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): -0.80 (с).

**Эксперименты в клеточных системах.** Культура клеток Vero получена из лаборатории культуры тканей Института вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН, штамм HSV-1/L<sub>2</sub> – из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН. Мутантный штамм HSV-1/L<sub>2</sub>/R, резистентный к АСВ, получен согласно методике [9].

Количественное определение выживаемости клеток при исследовании цитотоксичности и терапевтического действия исследуемых соединений, определение инфекционного титра и оценка антивирусного действия препаратов проводились аналогично [9].

**Стабильность соединений в фосфатном буфере и нормальной сыворотке крови человека.** Инкубировали 100 мкл 500 мкМ раствора тестируемого соединения в фосфатно-солевом буфере (NaCl – 8.775 г; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.078 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.8 г, 1000 мл H<sub>2</sub>O, pH 7.2) или в нормаль-

ной сыворотке крови человека при 37°C. Через определенные промежутки времени (табл. 2) отбирали пробы (15 мкл), прибавляли MeOH (45 мкл), выдерживали 20 мин при -20°C (в случае сыворотки крови пробы центрифугировали на Eppendorf Centrifuge 5415 (Германия) при 15800 g и отбирали супернатант) и упаривали на установке Automatic Speed-Vac Concentrator AS260 (Savant, США). К остатку прибавляли 10 мкл 5 mM натрий-фосфатного буфера (pH 4.8) и анализировали ВЭЖХ. При работе с фосфонатами (II) и (IVa) использовали градиент А, для эфиров (III) и (Vr) – градиент Б.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 02-04-49009, 04-04-49454) и гранта Президента РАН по физико-химической биологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morfin F., Thouvenot D. // J. Clin. Virol. 2003. V. 26. P. 29–37.
2. De Bony F., Tod M., Bidault R., On N.T., Posner J., Rolan P. // Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 2002. V. 46. P. 458–463.
3. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Jasko M.V., Skoblov Yu.S., Yanvarev D.V., Ivanov A.V., Kukhanova M.K. // Collection Symposium Series. 2002. V. 5. P. 93–98.
4. Широкова Е.А., Ясько М.В., Хандажинская А.Л., Иванов А.В., Январев Д.В., Скоблов Ю.С., Проняева Т.Р., Федюк Н.В., Покровский А.Г., Куханова М.К. // Биоорган. химия. 2004. Т. 30. С. 273–280.
5. Галегов Г.А., Шобухов В.М., Леонтьева Н.А., Ясько М.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 906–909.
6. Karpenko I.L., Jasko M.V., Andronova V.L., Ivanov A.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Yu.S. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2003. V. 22. P. 319–328.
7. McGuigan C., Bellevergue P., Jones B.C.N.M. // Antiviral Chemistry & Chemotherapy. 1994. V. 5. P. 271–277.
8. Griengl H., Hayden W., Penn G., De Clercq E., Rosenwirth B. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. P. 1831–1839.
9. Александрова Л.А., Андронова В.Л., Карпенко И.Л., Скоблов Ю.С., Адани А., Галегов Г.А. // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. С. 455–461.

## The Synthesis and Antiherpetic Activity of Acyclovir Phosphonate Esters

M. V. Jasko\*, N. Yu. Ulanova\*, V. L. Andronova\*\*, A. V. Ivanov\*, I. L. Karpenko\*, M. K. Kukhanova\*, G. A. Galegov\*\*, and Yu. S. Skoblov\*\*

# Phone: +7(095) 135-6065; fax: +7(095) 135-1405; e-mail: skoblov@eimb.ru

\* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

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

Alkyl esters of acyclovir phosphite, alkoxycarbonylphosphonate, ethoxycarbonylmethylphosphonate, and aminocarbonylphosphonate were synthesized. Most of them were shown to inhibit the replication of type 1 herpes simplex virus in Vero cell culture. The stability in phosphate buffer and human blood serum was studied for several of the derivatives. A correlation between the stability and antiviral activity of the synthesized compounds is discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** acyclovir, herpes simplex virus, phosphonates