



УДК 577.113.3.017

НОВЫЕ 5-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА: СИНТЕЗ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2005 г. А. В. Иванов*, **, А. Р. Симонян*, Е. Ф. Беланов***, Л. А. Александрова**

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

**Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва;

***Институт молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл.

Поступила в редакцию 18.03.2005 г. Принята к печати 24.03.2004 г.

Осуществлен синтез новых аналогов 2'-дезоксисуридина, содержащих в 5-м положении азольные или оксимные группы. Показано, что в культуре клеток *Vero* аналоги нуклеозидов, несущие азольный цикл, обладают невысокой цитотоксичностью и антигерпетической активностью. Наиболее активным является производное имидазола. Алкилоксимы 5-формил-2'-дезоксисуридина также продемонстрировали способность подавлять репродукцию вируса герпеса, сравнимую с таковой у азолов, однако их цитотоксичность оказалась выше, в особенности у собственно оксима 5-формил-2'-дезоксисуридина. Синтезированные соединения не показали заметной активности в клетках, инфицированных различными вариантами вируса оспы.

Ключевые слова: нуклеозиды, аналоги; вирус простого герпеса, вирус оспы.

ВВЕДЕНИЕ

Многие 5-замещенные производные 2'-дезоксисуридина ингибируют репродукцию вирусов герпеса, например вируса герпеса простого (HSV) и вируса ветряной оспы/опоясывающего лишая (VZV). В терапии герпесвирусной инфекции применяются 5-йодо-, (E)-5-(2-бромвинил)- и 5-трифторметил-2'-дезоксисуридины [1]. Механизмы их действия различны. Так, 5-йодо-2'-дезоксисуридин в результате внутриклеточного фосфорилирования превращается в соответствующий нуклеозид-5'-трифосфат, который, являясь субстратом герпесвирусных ДНК-полимераз, терминирует дальнейший синтез вирусной ДНК. Напротив, трифосфат (E)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксисуридина может выступать не только как терминаторный субстрат, но и как конкурентный ингибитор герпесвирусных ДНК-полимераз. 5-Трифторметил-2'-дезоксисуридин в клетке фосфорилируется до 5'-монофосфата, который ингибирует тимидилатсинтазу [1].

5-Замещенные производные 2'-дезоксисуридина ингибируют репродукцию вируса осповакцины (Poxviridae) [2]. К числу наиболее удачных модификаций относят замену протона в 5-м положении ос-

татка урацила на галоген, нитро-, формильную, трифторметильную и винильную группы [2]. Механизм действия таких соединений включает их фосфорилирование до соответствующих 5'-монофосфатов, которые ингибируют превращение dUMP в dTMP, катализируемое тимидилатсинтазой. Таким образом, 5-модифицированные аналоги 2'-дезоксисуридина являются перспективными соединениями для создания противовирусных препаратов.

Целью данной работы являлся синтез и изучение противовирусной активности новых аналогов 2'-дезоксисуридина, содержащих в 5-м положении азольные или алкилоксимные группы.

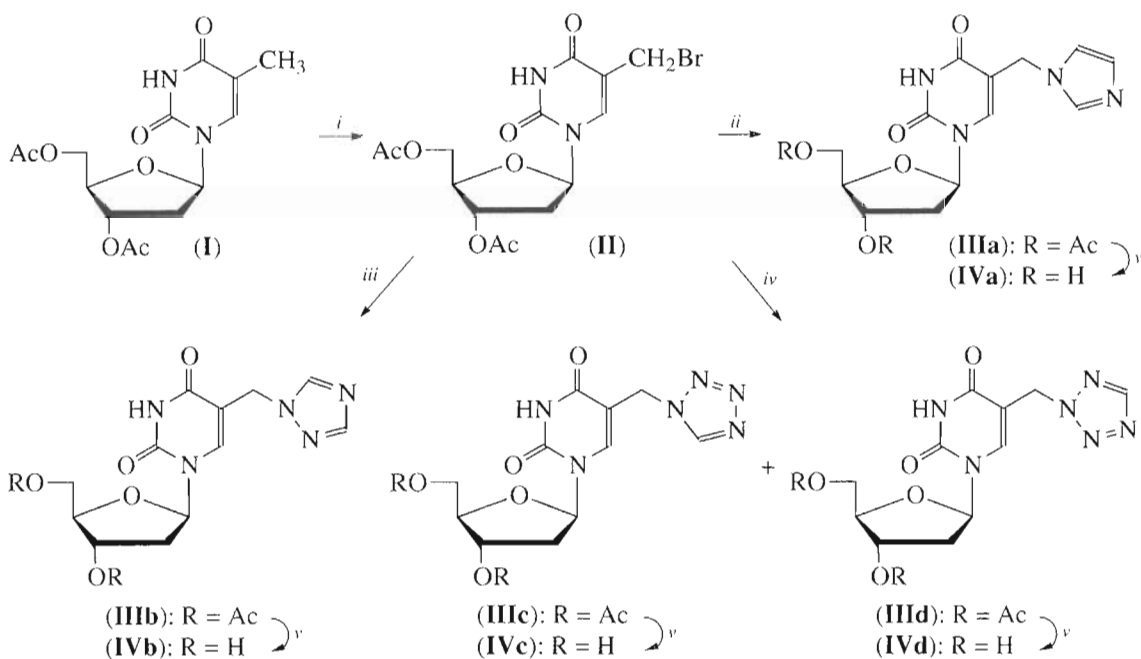
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевым соединением в синтезе азолов (IVa)–(IVd) (схема 1) являлся 5-бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксисуридин (II), который получали радикальным бромированием 3',5'-ди-*O*-ацетилтимидина (I) по известной методике [3]. Нуклеофильное замещение брома на имидазол, 1,2,4-триазол или тетразол в DMF приводило к соответствующим азольным производным (IIIa)–(IIId). Следует отметить, что в результате реакции бромида (II) с тетразолом образовывались *N*¹- и *N*²-замещенные тетразолы (IIIc) и (IIId) в соотношении 3 : 1.

Азолы нуклеозидов (IIIa)–(IIId) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентраций MeOH в хлороформе. Целе-

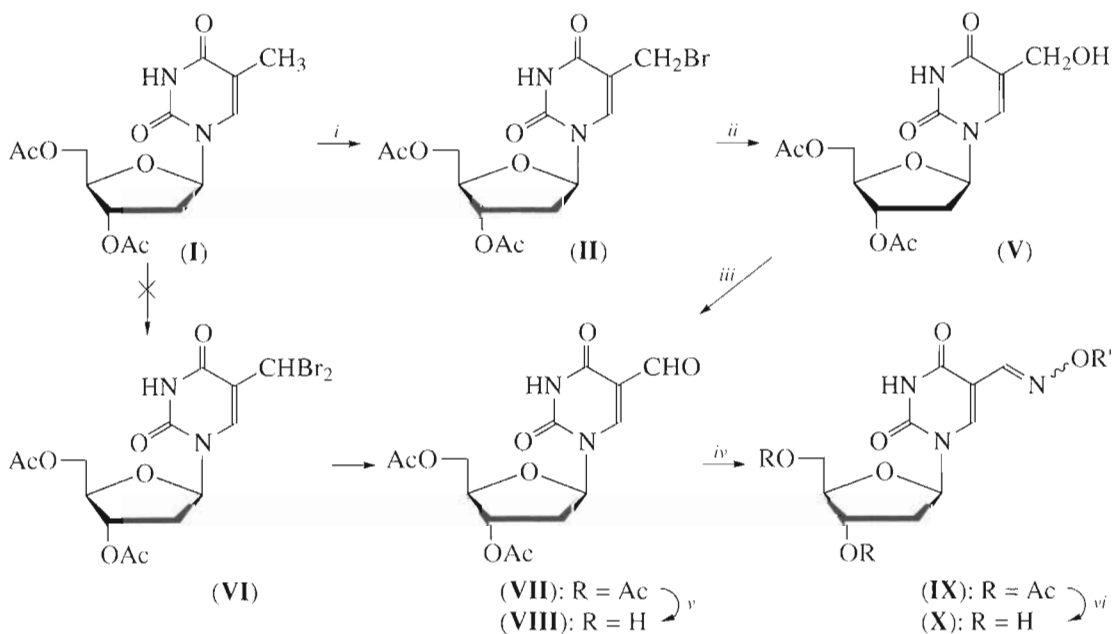
Сокращения: HSV-1/L₂ – вирус простого герпеса, тип 1, штамм L₂; ИД₅₀ – доза, ингибирующая вирусное цитопатогенное действие на 50%; ЦТД₅₀ – тканевая цитотоксическая доза, вызывающая изменение 50% клеточного монослоя; ИС – индекс селективности (отношение ЦТД₅₀ к ИД₅₀).

Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: ala2004@zmail.ru).



i) $\text{Br}_2/\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, ii) имидазол/DMF, iii) триазол/DMF, iv) тетразол/DMF, v) водный NH_3 /диоксан/ H_2O .

Схема 1.



$\text{R}' = \text{H, Me, C}_6\text{H}_5\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$

i) $\text{Br}_2/\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, ii) $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, iii) $\text{CrO}_3 \cdot \text{Py} \cdot \text{HCl}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, iv) $\text{R}'\text{ONH}_2/\text{Py}$, v) водный $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, vi) водный NH_3 /диоксан/ H_2O .

Схема 2.

вые нуклеозиды (IVa)–(IVd) получали обработкой соответствующих диацетатов (IIIa)–(III'd) водным аммиаком и очищали обращенно-фазовой хроматографией на колонке LiChroprep RP-8.

Исходным соединением в синтезе алкилоксимов (Xa)–(Xd) (схема 2) явился 5-формил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (VII), который вводили в реакцию с соответствующими *O*-алкилгидроксила-

Таблица 1. Соотношение *син*- и *анти*-изомеров оксимов и алкилоксимов (IXa)–(IXd) и (Xa)–(Xd)

	R'	Ацетильные производные (IX)		Незащищенные нуклеозиды (X)	
		<i>син</i> -	<i>анти</i> -	<i>син</i> -	<i>анти</i> -
a	H	50	50	37	63
b	Me	41	59	35	65
c	Bn	35	65	33	67
d	CH ₂ CH=CH ₂	38	62	26	74

Таблица 2. Цитотоксичность и антивирусный эффект на модели HSV-1 соединений (IVa)–(IVd) и (Xa)–(Xd) в культуре клеток *Vero*

Соединение	ЦТД ₅₀	ИД ₅₀ , мкМ	ИД ₉₅ , мкМ	ИС
(IVa)	>1000	31.25	1000	>32
(IVb)	260	65	260	4
(IVc)	>1000	250	>1000	4
(IVd)	231	58	463	4
(VIII)	0.12	н.о.	н.о.	–
(Xa)	19.5	19.5	н.о.	1
(Xb)	180	45	180	4
(Xc)	194	194	н.о.	1
(Xd)	225	112.5	н.о.	2
Ацикловир	2222	1.7	3.56	1310

минами в пиридине. Для получения производного (VII) в литературе предложено несколько методов [3, 4]. Первоначально мы предполагали получить его гидролизом 5-дибромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксигуанидина (VI). Следует отметить, что предложенный ранее метод синтеза дибромидов (VI) бромированием 3',5'-ди-*O*-ацетилтимидина (I) [3] не привел к целевому соединению (VII). Анализ реакционной смеси показал, что сначала образуется монобромид (II), увеличение времени реакции приводит к образованию ряда побочных продуктов, что делает неприменимым данный метод. Вследствие этого, 5-формилпроизводное (VII) было получено окислением 5-гидроксиметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксигуанидина (V) по методу [3]. Нуклеозид (V) был получен гидролизом 5-бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксигуанидина (II) водным раствором NaHCO₃ [3]. В качестве окислителя был выбран пиридинийхлорхромат (реактив Кори) [5], адсорбированный на окиси алюминия, использование которого позволяет достигать более высоких выходов при окислении первичных спиртов по сравнению с комплексом оксида хрома (VI) с пиридином (реактив Коллинза) [5]. Очистку ре-

акционной смеси проводили фильтрацией сорбированных на Al₂O₃ соединений хрома с последующей хроматографией фильтрата на силикагеле в градиенте концентраций MeOH в хлороформе. Деблорированный 5-формил-2'-дезоксигуанидин (VIII) был получен обработкой соответствующего диацетата (VII) раствором триэтиламина в водном метаноле.

Реакция 5-формилпроизводного (VII) с соответствующими гидрохлоридами гидроксиланамина и его *O*-алкилированных производных в пиридине протекала с практически количественными выходами и приводила к смеси *син*- и *анти*-конформеров алкилоксимов (IXa)–(IXd). Соотношение изомеров составляло от 1 : 1 в случае незамещенного гидроксиланамина (соединение (IXa)) до 1 : 2 в пользу *анти*-изомера для *O*-бензилгидроксиланамина (соединение (IXc)) (таблица 1). Последующее удаление защитных групп приводит к увеличению доли *анти*-конформера. Выделение продуктов реакции (IXa)–(IXd) проводили хроматографией на силикагеле в градиенте концентраций MeOH в хлороформе без разделения изомеров. Целевые соединения (Xa)–(Xd) были получены обработкой соответствующих диацетатов (IXa)–(IXd) водным аммиаком и очищены обращенно-фазовой хроматографией на колонке LiChroprep RP-8.

Структуру полученных соединений подтверждали методами УФ-, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. УФ-спектры нуклеозидов, содержащих в 5-м положении азольный цикл, практически не отличаются от спектра тимидина, в то время как введение в 5-е положение остатка уридина формильной группы и образование алкилоксимных производных приводят к сдвигу максимума поглощения в длинноволновую область (λ_{\max} 276 нм для 5-формил-2'-дезоксигуанидина и λ_{\max} 290–294 нм для алкилоксимов). Конфигурацию *N*¹- и *N*²-замещенных производных тетразола подтверждали на основании данных ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Так, хим. сдвиг атома углерода СН-группы азола в случае *N*¹-замещенного тетразола (IVc) составлял 143 м.д., а в случае *N*²-замещенного тетразола (IVd) – 153 м.д., что соответствует литературным данным для *N*¹- и *N*²-замещенных тетразолов [6]. Кроме того, хим. сдвиг протона азолов в спектрах ¹H-ЯМР составлял 8.92 и 8.56 м.д. для соединений (IVc) и (IVd) соответственно. Примечательно, что положение сигнала данного протона *N*²-изомера (IVd) близко к положению соответствующего сигнала триазольного производного (IVb). Соотношение *син*- и *анти*-изомеров алкилоксимов (IXa)–(IXd) и (Xa)–(Xd) определяли при помощи ¹H-ЯМР-спектроскопии. Хим. сдвиги протонов СННО и Н6 в случае *син*-изомеров составляли 8.9–9.2 и 7.3–7.6 м.д. соответственно, а хим. сдвиги данных протонов у *анти*-изомеров были практически одинаковыми и составляли 7.8–8.2 м.д. В УФ-спектрах алкилоксимов (Xa)–(Xd) наблю-

дался сдвиг максимума поглощения в длинноволновую область на 14–18 нм.

Антивирусную активность исследовали в культуре клеток *Vero*, инфицированных вирусами герпеса и вирусами семейства оспы. Антигерпетическую активность исследуемых соединений оценивали по их способности ингибировать развитие вирус-индуцированного цитопатогенного эффекта вируса на 50% по методам, описанным ранее [7]. Синтезированные соединения обладали умеренной противогерпетической активностью. Так, среди азолсодержащих нуклеозидов (IVa)–(IVd) наибольшую активность проявило производное имидазола (IVa), ИС которого составил около 32, что в 40 раз ниже, чем у ацикловира. Активность производных 1,2,4-триазола (IVb) и *N*²-замещенного тетразола (IVd) была в 2 раза, а *N*¹-изомера тетразола (IVc) – в 8 раз ниже, чем активность соединения (IVa). Алкилоксимы 5-формил-2'-дезоксинуридина (Xa)–(Xd) также продемонстрировали способность подавлять репродукцию вируса герпеса, сравнимую с активностью азолов (ИС составлял от 1 до 4), однако их цитотоксичность оказалась выше, особенно у алкилоксима 5-формил-2'-дезоксинуридина (Xa). Противогерпетическая активность 5-формил-2'-дезоксинуридина (VIII) не выявлена, при этом он обладал значительной токсичностью. Это, по-видимому, связано с его мутагенным действием [8]. Таким образом, некоторые представленные в настоящем сообщении аналоги нуклеозидов являются малотоксичными для культуры клеток *Vero*, но низкоэффективными противогерпетическими агентами. Все синтезированные соединения не показали заметной активности в клетках, инфицированных вирусами семейства оспы (вирусами оспы человека, мышей, обезьян, коров и осповакцины).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались: тимидин, имидазол, триазол, тетразол, бром (Fluka, Швейцария), хлоргидрат *O*-метилгидроксиламина, пиридин, DMF (Aldrich, США), хлоргидрат гидроксиламина (Реакхим, Россия).

Хлоргидраты *O*-бензил- и *O*-(2-аллил)-гидроксиламина получены по методам [9, 10] соответственно.

5-Бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (II) и 5-гидроксиметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (V) получали по методу [3].

Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel (40–63 мкм, прямая фаза) и LiChroprep RP-8 (25–40 мкм, обращенная фаза) (Merck, Германия); ТСХ-контроль реакционных смесей проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах хло-

роформ–этанол 9 : 1 (система А) или диоксан–25% аммиак 4 : 1 (система Б).

Спектры ЯМР (шкала δ , м.д., константы спин-спинового взаимодействия приведены в герцах) регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker, США) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (внутренний стандарт – Me₄Si для CDCl₃ и DMSO-*d*₆ и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D₂O) и 100 МГц для ¹³C-ЯМР (внутренний стандарт – метанол). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-2401 P (Shimadzu, Япония).

Общая методика синтеза (5-азолилметил)-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридинов (IIIa)–(IIIд). К раствору 1 ммоль 5-бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридина (I) в 10 мл сухого DMF прибавляли 5 ммоль соответствующего азола. Смесь выдерживали 48 ч при 37°C, затем упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (20 мл), раствор промывали водой (2 × 15 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (0.5 мл) и наносили на колонку (2 × 17 см) с силикагелем. Элюцию проводили в градиенте концентраций метанола в хлороформе (0 → 5%). Фракции, содержащие целевые соединения, упаривали в вакууме.

5-Имидазолилметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (IIIa). Выход: 39%. УФ (H₂O): λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.78 (1 H, с, 3-NH), 7.75 (1 H, с, H6), 7.55 (1 H, с, H2"), 7.04 (1 H, с, H5"), 7.03 (1 H, с, H4"), 6.17 (1 H, дд, ³J_{1'2'a} 8.7, ³J_{1'2'b} 5.3, H1'), 5.13 (1 H, д, ³J_{2'a,3'} 6.0, H3'), 4.85 (2 H, с, 5-CH₂), 4.41 (1 H, м, H5'a), 4.32 (1 H, м, H4'), 4.22 (1 H, м, H5'b), 2.53 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.33, ³J_{1'2'b} 5.3, ³J_{2'b,3'} 1.2, H2'b), 2.11–2.02 (1 H, м, H2'a), 2.08 (3 H, с, CH₃), 2.06 (3 H, с, CH₃).

5-Триазолилметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (IIIb). Выход: 34%. УФ (H₂O): λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.69 (1 H, с, 3-NH), 8.31 (1 H, с, H3"), 7.88 (1 H, с, H6), 7.81 (1 H, с, H5"), 6.24 (1 H, дд, ³J_{1'2'a} 8.7, ³J_{1'2'b} 5.6, H1'), 5.20 (1 H, м, H3'), 5.12 (1 H, д, ²J_{ab} 14.8, 5-CH₂a), 4.97 (1 H, д, ²J_{ab} 14.8, 5-CH₂b), 4.38 (1 H, м, H5'a), 4.31 (2 H, м, H4', H5'b), 2.53 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1'2'b} 5.6, ³J_{2'b,3'} 1.6, H2'b), 2.17–2.01 (1 H, м, H2'a), 2.16 (3 H, с, CH₃), 2.10 (3 H, с, CH₃).

5-(1-Тетразолилметил)-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (IIIc). Выход: 31%. УФ (H₂O): λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.75 (1 H, с, 3-NH), 8.92 (1 H, с, H5"), 7.96 (1 H, с, H6), 6.22 (1 H, дд, ³J_{1'2'a} 8.4, ³J_{1'2'b} 5.3, H1'), 5.34 (1 H, д, ²J_{ab} 14.7, 5-CH₂a), 5.24 (1 H, д, ²J_{ab} 14.7, 5-CH₂b), 5.20 (1 H, м, H3'), 4.46 (1 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.8, ³J_{5'a,4'} 5.6, H5'a), 4.30–4.27 (2 H, м, H5'b, H4'), 2.55 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1'2'b} 5.3, ³J_{2'a,3'} 1.6, H2'b), 2.18 (3 H, с, CH₃), 2.10 (3 H, с, CH₃), 2.14–2.01 (1 H, м, H2'a). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.67 (COAc), 170.32 (COAc), 162.67 (C4), 149.74 (C2), 143.53 (C5"), 140.61 (C6), 107.72 (C5), 86.02 (C1'),

82.90 (C4'), 74.07 (C3'), 63.60 (C5'), 44.44 (5-CH₂), 37.91 (C2'), 20.86 (CH₃), 20.78 (CH₃).

5-(2-Тетразолилметил)-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридин (IIIд). Выход: 12%. УФ (H₂O): λ_{max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.42 (1 H, уш.с, 3-NH), 8.48 (1 H, с, H5''), 7.77 (1 H, с, H6), 6.21 (1 H, дд, ³J_{1,2a} 8.4, J_{1,2b} 5.6, H1'), 5.61 (1 H, д, ²J_{ab} 14.6, 5-CH₂a), 5.48 (1 H, д, ²J_{ab} 14.6, 5-CH₂b), 5.19 (1 H, м, H3'), 4.48 (1 H, м, H5'a), 4.28–4.23 (2 H, м, H4', H5'b), 2.57 (1 H, ддд, ²J_{2a2b} 14.3, ³J_{1,2b} 5.6, ³J_{2b,3'} 1.6, H2'b), 2.19–2.10 (1 H, м, H2'a), 2.09 (3 H, с, CH₃), 2.07 ((3 H, с, CH₃) + 5'Ac). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.41 (COAc), 170.27 (COAc), 161.60 (C4), 153.03 (C5''), 149.65 (C2), 139.97 (C6), 107.50 (C5), 85.93 (C1'), 82.82 (C4'), 73.97 (C3'), 63.64 (C5'), 48.41 (5-CH₂), 37.95 (C2'), 20.77 (2 CH₃).

Общая методика синтеза 5-азолилметил-2'-дезоксуридинов (IVa)–(IVd) и алкилоксимов 5-формил-2'-дезоксуридина (Xa)–(Xd). К раствору 0.2 ммоль соответствующего 5-азолилметил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (IIIa)–(IIIд) или алкилоксима 5-формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (Xa)–(Xd) в 2 мл диоксана добавляли 1 мл 24% водного NH₃ и оставляли на 20 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку с LiChroprep RP-8 (2 × 18 см). Продукты элюировали в градиенте концентраций MeOH (0 → 7%) в 0.01 M NH₄HCO₃. Фракции, содержащие целевые соединения, упаривали в вакууме, остаток упаривали с водой (2 × 15 мл) и лиофилизировали из воды.

5-Имидазолилметил-2'-дезоксуридин (IVa). Выход: 88%. УФ (H₂O): λ_{max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.66 (1 H, с, H6), 7.61 (1 H, с, H2''), 7.01 (1 H, с, H4''), 6.87 (1 H, с, H5''), 6.10 (1 H, т, ³J_{1,2'} 6.5, H1'), 4.27 (1 H, м, H3'), 3.88 (1 H, ддд, ³J_{4'5'a} 4.7, ³J_{4'3'} 4.1, ³J_{4'5'b} 3.4, H4'), 3.66 (1 H, дд, ²J_{5'a5'b} 12.5, H5'b), 3.55 (1 H, дд, ²J_{5'a5'b} 12.5, ³J_{4'5'a} 4.7, H5'a), 2.27 (1 H, ддд, ²J_{2a2b} 14.3, ³J_{1,2'} 6.5, ³J_{2a,3'} 4.7, H2'a), 2.18 (1 H, ддд, ²J_{2a2b} 14.3, ³J_{1,2'} 6.5, ³J_{2b,3'} 6.3, H2'b).

5-Триазолилметил-2'-дезоксуридин (IVb). Выход: 85%. УФ (H₂O): λ_{max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.39 (1 H, с, H3''), 7.92 (1 H, с, H5''), 7.91 (1 H, с, H6), 6.15 (1 H, т, ³J_{1,2'} 6.5, H1'), 5.04 (2 H, с, 5-CH₂), 4.34 (1 H, м, H3'), 3.92 (1 H, м, H4'), 3.71 (1 H, дд, ²J_{5'a5'b} 12.8, ³J_{5'a,4'} 3.4, H5'a), 3.62 (1 H, дд, ²J_{5'a5'b} 12.8, ³J_{5'b,4'} 5.0, H5'b), 2.35–2.22 (2 H, м, H2').

5-(1-Тетразолилметил)-2'-дезоксуридин (IVc). Выход: 82%. УФ (H₂O): λ_{max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 9.04 (1 H, с, H5''), 8.03 (1 H, с, H6), 6.10 (1 H, т, ³J_{1,2'} 6.5, H1'), 5.26 (2 H, с, 5-CH₂), 4.30 (1 H, м, H3'), 3.89 (1 H, м, H4'), 3.70 (1 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.6, ³J_{5'a,4'} 3.3, H5'a), 3.60 (1 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.6, ³J_{5'b,4'} 4.8, H5'b), 2.35–2.15 (2 H, м, H2').

5-(2-Тетразолилметил)-2'-дезоксуридин (IVd). Выход: 86%. УФ (H₂O): λ_{max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.59 (1 H, с, H5''), 8.06 (1 H, с, H6), 6.13 (1 H, т, J_{1,2'} 6.5, H1'), 5.47 (2 H, с, 5-CH₂), 4.32 (1 H, м, H3'),

3.90 (1 H, м, H4'), 3.70 (1 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.8, ³J_{5'a,4'} 3.4, H5'a), 3.60 (1 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.8, ³J_{5'b,4'} 4.7, H5'b), 2.32–2.27 (2 H, м, H2').

5-Формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридин (VII). К раствору 6 г (4.6 ммоль) 5-гидроксиметил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (V) в 50 мл сухого дихлорэтана добавляли четыремья порциями 12.8 г CrO₃ · Ру · HCl/Al₂O₃ (12.8 ммоль). Смесь выдерживали 18 ч при 25°C, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (2.5 мл) и наносили на колонку (2.1 × 22 см) с силикагелем. Элюцию проводили в градиенте концентраций метанола в хлороформе (0 → 3%). Фракции, содержащие целевое соединение, упаривали в вакууме. Выход: 1.17 г (72%). УФ (H₂O): λ_{max} 275.8 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.97 (1 H, с, CHO), 8.45 (1 H, с, H6), 6.29 (1 H, дд, ³J_{1,2'a} 7.8, ³J_{1,2'b} 5.9, H1'), 5.22 (1 H, м, H3'), 4.38–4.27 (3 H, м, H4', H5'), 2.58 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1,2'b} 5.9, ³J_{2'b,3'} 2.2, H2'b), 2.25 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1,2'a} 7.8, ²J_{2'a,3'} 6.8, H2'a), 2.17 (3 H, с, CH₃), 2.08 (3 H, с, CH₃).

5-Формил-2'-дезоксуридин (VIII). Раствор 30 мг (0.1 ммоль) 5-формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (VII) в 5 мл 0.9 M раствора Et₃N в 50% водного MeOH выдерживали 2 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку с LiChroprep RP-8 (2 × 18 см). Продукт элюировали в градиенте концентраций MeOH (0 → 7%) в 0.01 M NH₄HCO₃. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме, остаток упаривали с водой (2 × 15 мл) и лиофилизировали из воды. Выход: 21 мг (93%). УФ (H₂O): λ_{max} 275.8 нм. ¹H-ЯМР (DMSO-d₆): 9.97 (1 H, с, CHO), 8.39 (1 H, с, H6), 6.18 (1 H, дд, ³J_{1,2'a} 7.8, ³J_{1,2'b} 5.9, H1'), 5.22 (1 H, м, H3'), 4.38–4.27 (3 H, м, H4', H5'), 2.58 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1,2'b} 5.9, ³J_{2'b,3'} 2.2, H2'b), 2.25 (1 H, ддд, ²J_{2'a2'b} 14.3, ³J_{1,2'a} 7.8, ²J_{2'a,3'} 6.8, H2'a).

Общая методика синтеза алкилоксимов 5-формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (IXa)–(IXd). К раствору 5-формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (VII) (0.1 ммоль) в 2 мл пиридина прибавляли раствор хлоргидрата гидроксилamina или его соответствующего О-алкилированного производного (0.1 ммоль) в 5 мл пиридина и выдерживали в течение 20 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (20 мл), раствор промывали водой (2 × 15 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (0.5 мл) и наносили на колонку (2 × 17 см) с силикагелем. Элюцию проводили в градиенте концентраций метанола в хлороформе (0 → 10%). Фракции, содержащие целевые соединения, упаривали в вакууме.

Оксим 5-формил-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксуридина (IXa). Выход: 90%. УФ (H₂O): λ_{max} 290.5 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.89 (1 H, уш.с, 3-NH), 9.86 (1 H, уш.с, 3-NH), 9.20 (0.5 H, с, 5-CH, син-), 8.08 (1 H, с,

H6, *анти*-), 5-CH, *анти*-), 7.59 (0.5 H, с, H6, *син*-), 6.32 (1 H, м, H1'), 5.28 (1 H, м, H3'), 4.40–4.25 (3 H, м, H5, H4'), 2.65–2.48 (1 H, м, H2'a), 2.38–2.17 (1 H, м, H2'b), 2.15 (3 H, с, CH₃), 2.05 (3 H, с, CH₃).

O-Метил оксим 5-формил-3',5'-ди-O-ацетил-2'-дезоксинуридина (IXb). Выход: 94%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.8 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.56–9.53 (1 H, уш.с, 3-NH), 9.03 [0.41 H, уш.с, 5-CH= (*син*-)], 8.08 [0.59 H, с, H6 (*анти*-)], 8.04 [0.59 H, с, H6, CH= (*анти*-)], 7.50 [0.41 H, с, H6 (*син*-)], 6.35 (0.59 H, дд, ³J_{1,2'a} 8.7, ³J_{1,2'b} 5.6, H1', *анти*-), 6.25 (0.41 H, дд, ³J_{1,2'a} 7.5, ³J_{1,2'b} 5.9, H1', *син*-), 5.25 (1 H, м, H3'), 4.35–4.28 (3 H, м, H5', H4'), 3.92 (3 × 0.41 H, с, CH₃ON, *син*-), 3.82 (3 × 0.59 H, с, CH₃ON, *анти*-), 2.65–2.45 (1 H, м, H2'a), 2.26–2.11 (1 H, м, H2'b), 2.18, 2.13 (6 H, с, 3'Ac + 5'Ac).

O-Бензилоксим 5-формил-3',5'-ди-O-ацетил-2'-дезоксинуридина (IXc). Выход: 92%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.9 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.85 (1 H, уш.с, 3-NH), 8.99 [0.35 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.15 [0.65 H, с, H6 (*анти*-)], 8.07 [0.65 H, с, 5-CH= (*анти*-)], 7.50 [0.35 H, с, H6 (*син*-)], 7.42–7.25 (5 H, м, C₆H₅), 6.30 (0.65 H, дд, ³J_{1,2'} 8.4, ³J_{1,2''} 6.2, H1', *анти*-), 6.19 [0.35 H, дд, ³J_{1,2'} 7.8, ³J_{1,2''} 5.9, H1', *син*-), 5.24 (0.35 H, м, H3', *син*-), 5.18 (0.65 H, м, H3', *анти*-), 5.10 (2 × 0.65 H, с, CH₂C₆H₅, *анти*-), 4.95 (2 × 0.35 H, с, CH₂C₆H₅, *син*-), 4.39–4.28 (3 × 0.65 H, м, H5', H4', *анти*-), 4.13 (0.35 H, м, H4', *син*-), 3.88 (0.35 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.1, ³J_{5'a,4'} 4.7, H5'a, *син*-), 3.73 [0.35 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 12.1, ³J_{5'a,4'} 4.1, H5'b (*син*-)], 2.58–2.45 (1 H, м, H2'b), 2.25–2.18 (1 H, м, H2'a), 2.10 (3 H, с, CH₃), 1.98 (3 H, с, CH₃).

O-(2-Аллил)оксим 5-формил-3',5'-ди-O-ацетил-2'-дезоксинуридина (IXd). Выход: 88%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.7 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.69 (1 H, уш.с, 3-NH), 9.03 [0.38 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.10 [0.62 H, с, H6 (*анти*-)], 8.07 [0.62 H, с, 5-CH= (*анти*-)], 7.54 [0.38 H, с, H6 (*син*-)], 6.32 (0.62 H, дд, J_{1,2'a} 8.4, J_{1,2'b} 5.6, H1', *анти*-), 6.24 (0.38 H, дд, J_{1,2'a} 7.2, J_{1,2'b} 6.2, H1', *син*-), 6.02–5.88 (1 H, м, H2''), 5.38–5.10 (3 H, м, H3', H3''), 4.65 (0.38 H, д, ³J_{1',2''} 5.6, H1'', *син*-), 4.56 (0.62 H, д, ³J_{1',2''} 5.6, H1'', *анти*-), 4.33 (2 × 0.62 H, м, H5', *анти*-), 4.29 (2 × 0.38 H, м, H5', *син*-), 0.62 H, м, H4', *анти*-), 4.24 (0.38 H, м, H4', *син*-), 2.58–2.45 (1 H, м, H2'a), 2.25–2.18 (1 H, м, H2'b), 2.12 (3 H, с, CH₃), 1.97 (3 H, с, CH₃).

Оксим 5-формил-2'-дезоксинуридина (Ха). Выход: 83%. УФ (H₂O): λ_{max} 289.5 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 9.12 [0.37 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.07 [0.63 H, с, 5-CH= (*анти*-)], 7.86 [0.63 H, с, H6 (*анти*-)], 7.31 [0.37 H, с, H6 (*син*-)], 6.16 [0.37 H, т, J_{1,2'} 6.5, H1', *син*-), 6.11 (0.63 H, т, J_{1,2'} 6.2, H1', *анти*-), 4.33–4.22 (1 H, м, H3'), 3.94–3.85 (1 H, м, H4'), 3.73–3.55 (2 H, м, H5'), 2.35–2.15 (2 H, м, H2').

O-Метил оксим 5-формил-2'-дезоксинуридина (Хб). Выход: 86%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.1 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 9.08 [0.35 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.24 [0.65 H, с, H6 (*анти*-)], 8.00 [0.65 H, с, CH= (*анти*-)], 7.42 [0.35 H, с, H6 (*син*-)], 6.28–6.20 (1 H, с, H1'),

4.47–4.41 (1 H, м, H3'), 4.06–4.01 (1 H, м, H4'), 3.82 (3 H, м, CH₃), 3.77–3.73 (2 H, м, H5'), 2.46–2.33 (2 H, м, H2').

O-Бензилоксим 5-формил-2'-дезоксинуридина (Хс). Выход: 78%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.6 нм. ¹H-ЯМР (CD₃OD): 9.17 [0.33 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.44 [0.67 H, с, H6 (*анти*-)], 8.01 [0.67 H, с, 5-CH= (*анти*-)], 7.45–7.32 [0.35 H + 5 H, м, H6 (*син*-), C₆H₅], 6.30–6.22 (1 H, м, H1'), 5.23 (2 × 0.33 H, с, CH₂C₆H₅, *син*-), 5.13 (2 × 0.67 H, с, CH₂C₆H₅, *анти*-), 4.40 (0.67 H, м, H3', *анти*-), 4.19 (0.33 H, м, H3', *син*-), 3.95 (1 H, м, H4', *анти*-), 3.88 (0.33 H, м, H4', *син*-), 3.80 (0.67 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 11.8, ³J_{5'a,4'} 3.4, H5'a, *анти*-), 3.74 (0.67 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 11.8, ³J_{5'a,4'} 3.8, H5'b, *анти*-), 3.46 (2 × 0.33 H, м, H5'a, *син*-), 2.38–2.25 (2 × 0.67 H + 0.33 H, м, H2', *анти*-), 0.33 H, м, H2'a, *син*-), 2.18–2.02 (0.33 H, м, H2'a, *син*-).

O-(2-Аллил)оксим 5-формил-2'-дезоксинуридина (Хд). Выход: 80%. УФ (H₂O): λ_{max} 293.5 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 9.03 [0.26 H, с, 5-CH= (*син*-)], 8.11 [0.74 H, с, H6 (*анти*-)], 7.89 [0.74 H, с, 5-CH= (*анти*-)], 7.28 [0.26 H, с, H6 (*син*-)], 6.13 (0.26 H, т, J_{1,2'} 7.1, H1', *син*-), 6.09 (0.74 H, т, J_{1,2'} 7.0, H1', *анти*-), 5.93–5.84 (2 H, м, H2'), 5.23 (0.74 H, д, ²J_{2',3'a} 1.6, H3'a, *анти*-), 5.19 (0.26 H, д, ²J_{2',3'a} 1.6, H3'a, *син*-), 5.16 (0.74 H, д, ²J_{2',3'a} 8.6, H3'b, *анти*-), 5.14 (0.26 H, д, ²J_{2',3'a} 8.5, H3'b, *син*-), 4.54 (0.26 H, д, ³J_{1',2''} 5.7, H1'', *син*-), 4.47 (0.74 H, д, ³J_{1',2''} 5.9, H1'', *анти*-), 4.31 [0.74 H, м, H3' (*анти*-)], 4.27 [0.26 H, м, H3' (*син*-)], 3.89 (1 H, м, H4'), 3.70 [0.74 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 11.5, ³J_{5'a,4'} 3.1, H5'a (*анти*-)], 3.65 [0.74 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 11.5, ³J_{5'a,4'} 4.7, H5'b (*анти*-)], 3.63 [0.26 H, м, H5'a (*син*-)], 3.54 [0.26 H, дд, ²J_{5'a,5'b} 11.2, ³J_{5'a,4'} 4.2, H5'b (*син*-)], 2.38–2.13 (2 H, м, H2').

Эксперименты в клеточных системах

Для анализа антигерпетической активности использовали эталонный штамм HSV-1/L₂, полученный из государственной коллекции вирусов ГУНИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Вирусные штаммы были пассированы в смеси среды Игла и среды "199" (1 : 1) с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки. Использовали культуру клеток *Vero* (клетки почек африканских зеленых марьшшек), клон Е6. Клетки поддерживали в среде Игла "МЕМ" (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва), содержащей 7% эмбриональную телячью сыворотку (ПанЭко, Москва).

Антигерпетическую активность оценивали по способности исследуемых соединений ингибировать развитие вирус-индуцированного цитопатогенного действия на 50% по ранее описанной методике [7]. В качестве контрольного препарата использовали ацикловир, 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин (GlaxoWelcome, Великобритания).

Для оценки цитотоксичности соединений для неинфицированной культуры клеток *Vero* использо-

вали метод, основанный на способности мертвых клеток окрашиваться красителем трипановым синим [7]. За величину ЦТД₅₀ принимали ту концентрацию соединения, при которой гибель клеток через 72 ч контакта с изучаемыми соединениями не превышала 50% [11].

Противооспенное действие синтезированных соединений изучали на пяти штаммах вирусов (вирусы натуральной оспы человека, мышей, обезьян, коров и осповакцины), полученных из государственной коллекции вирусов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор". Для исследования антивирусной активности и токсичности использовали две культуры клеток: *Vero* и МК2. Антивирусный эффект синтезированных соединений оценивали по выживаемости клеток, инфицированных вирусом, при инкубации клеток с веществами.

Авторы благодарят В.Л. Андронову (ГУНИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН) за проведение экспериментов по определению антигерпетической активности синтезированных соединений. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 03-04-49080, 05-04-49493 и 05-04-49500), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии, МНТЦ (грант № 1989).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E.* // Nat. Rev. Drug Discovery. 2002. V. 1(1). P. 13–25.
2. *De Clercq E.* // Clinical Microbiology Reviews. 2001. V. 14. P. 382–397.
3. *Barwolff D., Langen P.* // Nucleic Acid Chemistry / Eds Townsend L.B., Tipson R.S. N. Y.: Wiley, 1978. V. 1. P. 359–366.
4. *Szmanda A., Markiewicz M., Godzina P., Markiewicz W.T.* // Collect. Czech. Chemical Commun. S.S. 2002. V. 5. P. 16–26.
5. *Тумце Л., Айхер Т.* Препаративная органическая химия: Реакции и синтеза в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории: Пер. с нем. под ред. Алексева Ю.М. М.: Мир, 1999.
6. *Ostrovsky V.A., Studentov E.P., Poplavsky V.S., Ivanova N.V., Gurskaya G.V., Zavodnik Y.E., Jasko M.V., Semizarov D.G., Krayevsky A.A.* // Nucleosides Nucleotides 1995. V. 14. P. 1289–1300.
7. *De Clercq E., Descamps J., Verheist G., Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D.* // J. Infect. Dis. 1980. V. 141. P. 563–573.
8. *Klungland A., Paulsen R., Rolseth V., Yamada Y., Ueno Y., et al.* // Toxicol Lett. 2001. V. 119. P. 71–78.
9. *Хомутов Р.М., Северин Е.С., Гнучев Н.В., Деревянко Т.Я.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. № 8. С. 1820–1823.
10. *Хомутов А.Р., Хурс Е.Н., Хомутов Р.М.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 385–391.
11. *Александрова Л.А., Андропова В.Л., Карпенко И.Л., Скоблов Ю.С., Адани А., Галегов Г.А.* // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. С. 455–461.

Synthesis and Antiviral Activity of New 5-Substituted 2'-Deoxyuridine Derivatives

A. V. Ivanov^{1,2}, A. R. Simonyan¹, E. F. Belanov³, and L. A. Aleksandrova^{1#}

[#] Phone: +7 (095) 135-6065; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: ala2004@zmail.ru

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

² Centre for Medical Studies, University of Oslo, Moscow, Russia

³ Institute of Molecular Biology, NPO Vector,
pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

New 5-azole- and 5-oxime-substituted analogues of 2'-deoxyuridine are synthesized. The analogues with azole ring manifest low toxicities and antiherpetic activities on *Vero* cell culture, the imidazole derivative being the most active. The inhibitory effects of oximes of 5-formyl-deoxyuridine are comparable with those of the azole-containing nucleoside analogues, although their cytotoxicities are found to be higher; oxime of 5-formyldeoxyuridine is particularly toxic. The nucleoside analogues synthesized exhibit no marked activity on cell cultures infected with various variants of poxvirus. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: herpes simplex virus, nucleoside analogues, poxvirus