



ФОСФОРАМИДАТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЦИКЛОВИРА – ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА

© 2011 г. Н. Ф. Закирова, А. В. Шипицын[#], М. В. Ясько, С. Н. Кочетков

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 13.04.2011 г. Принята к печати 19.04.2011 г.

Синтезирован ряд новых фосфорамидатов ацикловира – соединений, представляющих интерес как противовирусные препараты против резистентных штаммов вируса герпеса. Было предложено несколько методов синтеза этих соединений. Оптимальным оказался вариант получения фосфомоноамидатов через фосфомонохлоридат с последующей обработкой данного интермедиата различными аминами. Два соединения показали умеренную активность против HSV-1.

Ключевые слова: ацикловир; вирус герпеса; фосфорамидаты.

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеозидные аналоги – основной класс терапевтически эффективных противовирусных и противораковых препаратов. Для проявления биологической активности эти соединения должны быть последовательно фосфорилированы клеточными киназами до соответствующих 5'-моно-, ди- и трифосфатов. С целью увеличения терапевтической эффективности и предотвращения выработки резистентности к нуклеозидным аналогам был разработан ряд подходов. Одним из таких подходов, получивших название ProTide, является использование липофильных производных монофосфатов нуклеозидов [1, 2]. Фосфорамидатный ProTide-подход, успешно развиваемый в случае нуклеозидов, обладающих противовирусной и противораковой активностями [3–6], заключается в маскировке заряда фосфатной группы в нуклеотиде остатками арила и эфира аминокислоты. В этом случае проникновение через клеточные мембраны происходит посредством пассивной диффузии. Оказавшись внутри клетки, фосфорамидат активируется: первоначально происходит ферментативный гидролиз эфирной группы аминокислоты, катализируемый клеточными эстеразами или карбоксипептидазами, затем спонтанная циклизация с одновременным выщеплением арильной группы и раскрытие образующегося нестабиль-

ного цикла под действием воды. После гидролиза Р–N-связи ферментами фосфорамидатного типа происходит высвобождение нуклеозиднофосфата (схема 1). Недостатком соединений типа ProTide является их малая растворимость в воде, что отрицательно сказывается и на их биодоступности.

Недавно ProTide-подход был удачно применен и для производных ацикловира. Ацикловир (I) (9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин, Zovirax) – один из наиболее широко используемых и хорошо изученных препаратов в лечении герпесных (HSV, VZV и CMV) инфекций. Ацикловир, после последовательного фосфорилирования и превращения в активную форму – трифосфат, ингибирует синтез вирусной ДНК. Первая стадия – фосфорилирование, происходит при участии вирусспецифических ферментов. Для вирусов Herpes simplex, Varicella zoster и Эпштейна-Барра таким ферментом является вирусная тимидинкиназа, которая присутствует в пораженных вирусом клетках. Участие специфических вирусных ферментов в первом кинировании ацикловира в значительной степени объясняет его селективность. Процесс последующего превращения монофосфата ацикловира в трифосфат завершается клеточными киназами, после чего он конкурентно ингибирует синтез вирусной ДНК и, тем самым, блокирует репликацию вируса [7].

Производные ацикловири монофосфата показали противовирусную активность на резистентных штаммах HSV-1 и HSV-2, а также против VZV. Данная активность обусловлена тем, что эти соединения не нуждаются в первом кинировании вирусной тимидинкиназой [8].

Сокращения: TFAA – трифторуксусный ангидрид; MeIm – N-метилимидазол; AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; HSV – herpes simplex virus (вирус простого герпеса человека); VZV – вирус Varicella zoster (ветряная оспа); CMV – cytomegalovirus (цитомегаловирус).

[#] Автор для связи (тел.: (499) 135-60-65; факс: (499) 135-14-05; эл. почта: alex_chip@email.ru).

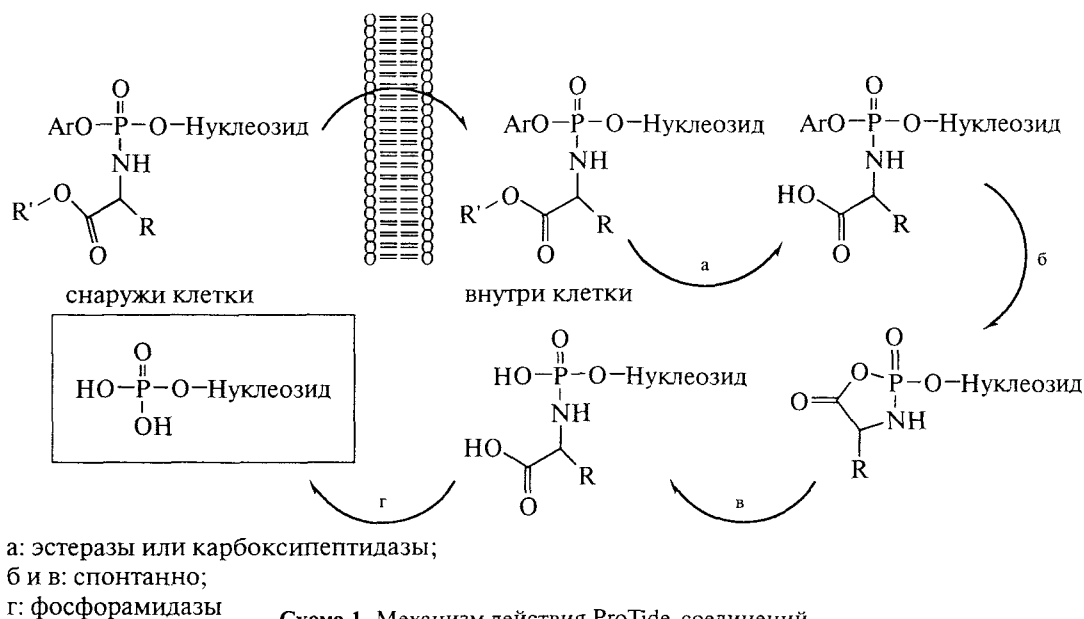


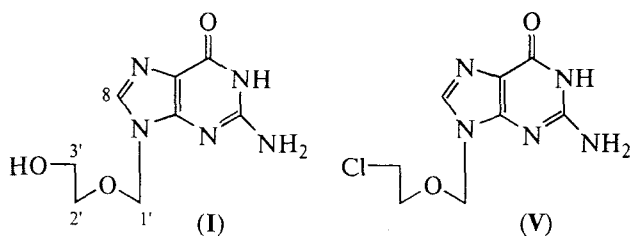
Схема 1. Механизм действия ProTide-соединений.

Целью данной работы является синтез производных ацикловира, которые были бы лучше растворимы в воде и не требовали участия вирусной тимидинкиназы для превращения в активную форму.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы представляем синтез новых производных ацикловира. Ранее нами было показано, что фосфомоноамидаты нуклеозидов, в отличие от их фосфодиамидатов, в ряде случаев обладают большей противовирусной активностью, чем исходные нуклеозиды [9]. Так, фосфоморфолидат АЗТ оказался существенно более активным против вируса иммунодефицита человека, чем его фосфодиморфолидат и сам АЗТ. Кроме того, фосфомоноамидаты, в зависимости от природы амина, могут обладать большей водорастворимостью, чем исходные нуклеозиды и, следовательно, могут являться депо-формами нуклеозидмонофосфата. Исходя из этого можно предположить, что и фосфомоноамидаты ацик-

ловира, проникая через клеточные мембраны и подвергаясь ферментативным реакциям, смогут обходить первое кинирование, и, таким образом, будут проявлять активность как на обычном, так и на ацикловиррезистентном штаммах вируса.



Продукты реакции ацикловира с хлорокисью фосфора.

Для синтеза фосфомоноамидатов ацикловира мы использовали реакцию нуклеозида с хлорокисью фосфора в триэтилфосфате с последующей обработкой образующегося фосфолихлоридата избытком соответствующего амина (схема 2) [10].

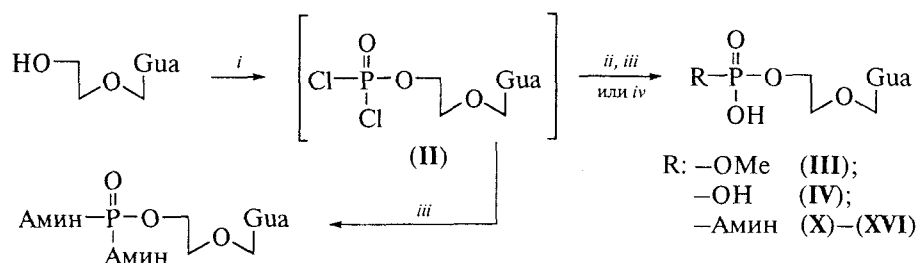


Схема 2. Общая схема получения фосфорамидатов ацикловира через фосфохлоридатные производные.

i) POCl_3 , триэтилфосфат, $+4^\circ\text{C}$, 2–4 ч или POCl_3 , триэтилфосфат, -18°C , 4 ч; ii) 2 экв. воды, $+4^\circ\text{C}$, 30 мин;

iii) амин/ MeOH , $+4^\circ\text{C}$, 2 ч; iv) амин/ $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ /водный диоксан, $+4^\circ\text{C}$, 2 ч.

В литературе было отмечено, что использование метанола в качестве растворителя в этой реакции является оптимальным [11], так как сводит образование побочных продуктов к минимуму. Однако получить фосфоамидаты ацикловира по схеме 2 нам не удалось. Основными продуктами в реакции конденсации фосфодихлоридата ацикловира (II) с амином, растворенным в метаноле, были диэфирное производное — метилфосфат ацикловира (III) и монофосфат ацикловира (IV). Мы предполагаем, что после обработки фосфодихлоридата (II) водой, образующийся фосфомонохлоридат ацикловира предпочтительно реагирует с метанолом, а не с амином.

Ранее нами также было показано, что если не проводить обработку фосфодихлоридата (II) водой, то схема 2 является оптимальной для получения фосфодиамидатов нуклеозидов с выходом около 70% [10]. Однако следует отметить, что в случае ацикловира выход фосфодиамидата не столь велик и составляет не более 30%. Это можно объяснить тем, что в процессе реакции ацикловира с хлорокисью фосфора образуется 9-(2-хлорэтоксиметил)гуанин (V).

Следует отметить, что при обработке фосфодихлоридата (II) пирролидином и 30% водным аммиаком единственными продуктами реакции были фосфодипирролидат ацикловира (VI) и фосфодиамидат ацикловира (VII) соответственно (таблица). Следует также отметить, что соединения (VI) и (VII) были неустойчивы не только в кислых условиях, но и в слабощелочных средах (pH > 7) (условия ионооб-

менной и обращенно-фазовой хроматографий) они медленно гидролизировались до ацикловира (I).

Поскольку описанный выше метод не позволяет получить фосфорамидаты ацикловира с высокими выходами, мы использовали другой подход, заключающийся в обработке его активированного монофосфата подходящим амином. Активация фосфомоноэфирных групп — одна из ключевых задач нуклеотидной химии. Известно много активирующих агентов, таких, как карбодиимиды, арилсульфохлориды и ангидриды карбоновых кислот. В данной работе в качестве активатора фосфомоноэфирной группы монофосфата ацикловира (IV) нами был выбран трифторуксусный ангидрид (ТФАА) — легкодоступный и недорогой реагент. ТФАА известен как активатор карбоновых, фосфорных и других кислот в реакциях этерификации, проходящих в кислых условиях, где в качестве растворителя используется трифторуксусная кислота. Однако в нейтральных средах и в присутствии оснований, например в реакциях с аминами, происходит трифторацетилирование аминов, а не получение смешанных ангидридов соответствующих кислот [12]. В работе [13] было показано, что продуктом реакции активированного монофосфата нуклеозида с амином является сам монофосфат нуклеозида. В то же время, если проводить данную реакцию в присутствии нуклеофильного катализатора, то единственным продуктом реакции является фосфомоноамидат нуклеозида. На основании вышесказанного для синтеза фосфоамидатов ацикловира мы использовали следующую схему (схема 3).

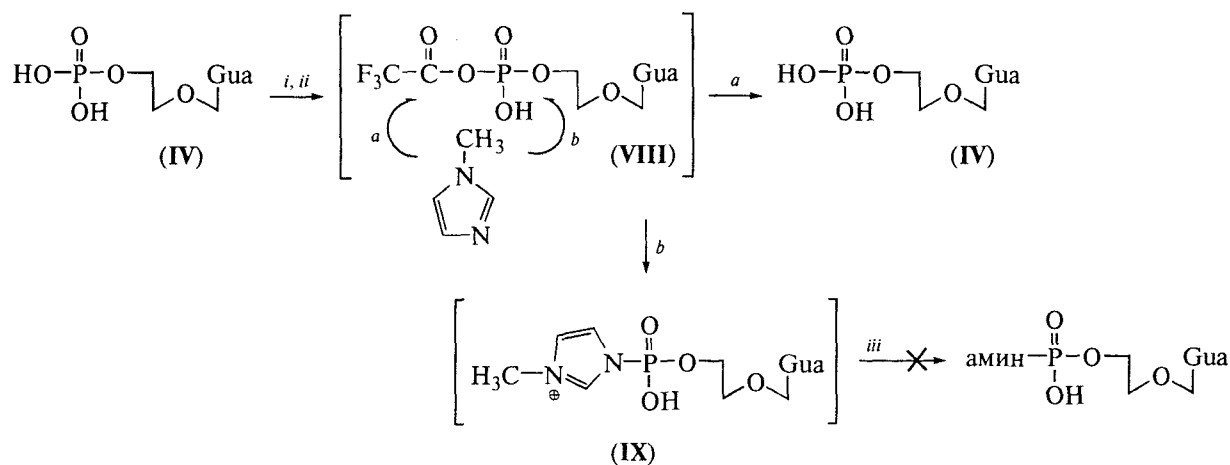
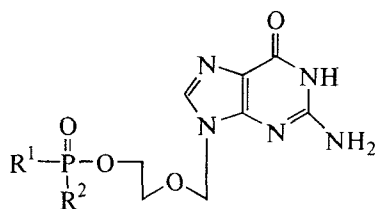


Схема 3. Активация монофосфата ацикловира и взаимодействие активированного производного с аминами.
 i) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, триэтиламин, DMF, $t_{\text{комн.}}$, 20 мин; ii) MeIm, триэтиламин, ацетонитрил, $t_{\text{комн.}}$, 10 мин; iii) амин/диоксан.

На первой стадии монофосфат ацикловира (IV) реагирует с ТФАА, давая смешанный ангидрид (VIII). Эта реакция практически необратима, так как нуклеофильность слабой (по второй ступени диссоциации) кислоты (IV) на порядки выше нуклеофильно-

сти сильной трифторуксусной кислоты. На второй стадии реакции нуклеофильный катализатор (метилимидазол) может атаковать смешанный ангидрид (VIII) по двум электрофильным центрам: по С-атому карбонильной группы (путь a) и по Р-атому фос-

Структуры синтезированных фосфорамидатов ацикловира



Соединение	R ¹	R ²
(VI)		
(VII)	H ₂ N—	—NH ₂
(X)		—OH
(XI)		—OH
(XII)		—OH
(XIII)		—OH
(XIV)		—OH
(XV)		—OH
(XVI)		—OH

фатной группы (путь *б*). Путь (*а*) кинетически более выгоден, но образуется термодинамически нестабильная система. Путь (*б*) приводит к образованию более устойчивой термодинамической системы, хотя и менее выгоден кинетически. Теоретически, в результате двух равновесных реакций накапливается термодинамически более стабильное производное (IX), которое затем и реагирует с нуклеофильным реагентом.

Однако на практике получить моноамидаты (X)–(XVI) (см. схему 2) нам не удалось. По всей вероятности, образующийся метилимидазолид (IX) не реагирует с аминами. К данному выводу мы пришли после другого неудачного эксперимента (здесь не приведен). А именно, обработка монофосфата

ацикловира (IV) карбонилдиимидазолом в безводном DMF в течение 1 ч, судя по ТСХ, приводит к образованию имидазолида монофосфата ацикловира. Но и в этом случае в присутствии амина не происходит замены имидазольной группы на амидную, даже при нагреве до +37°C в течение 20 ч.

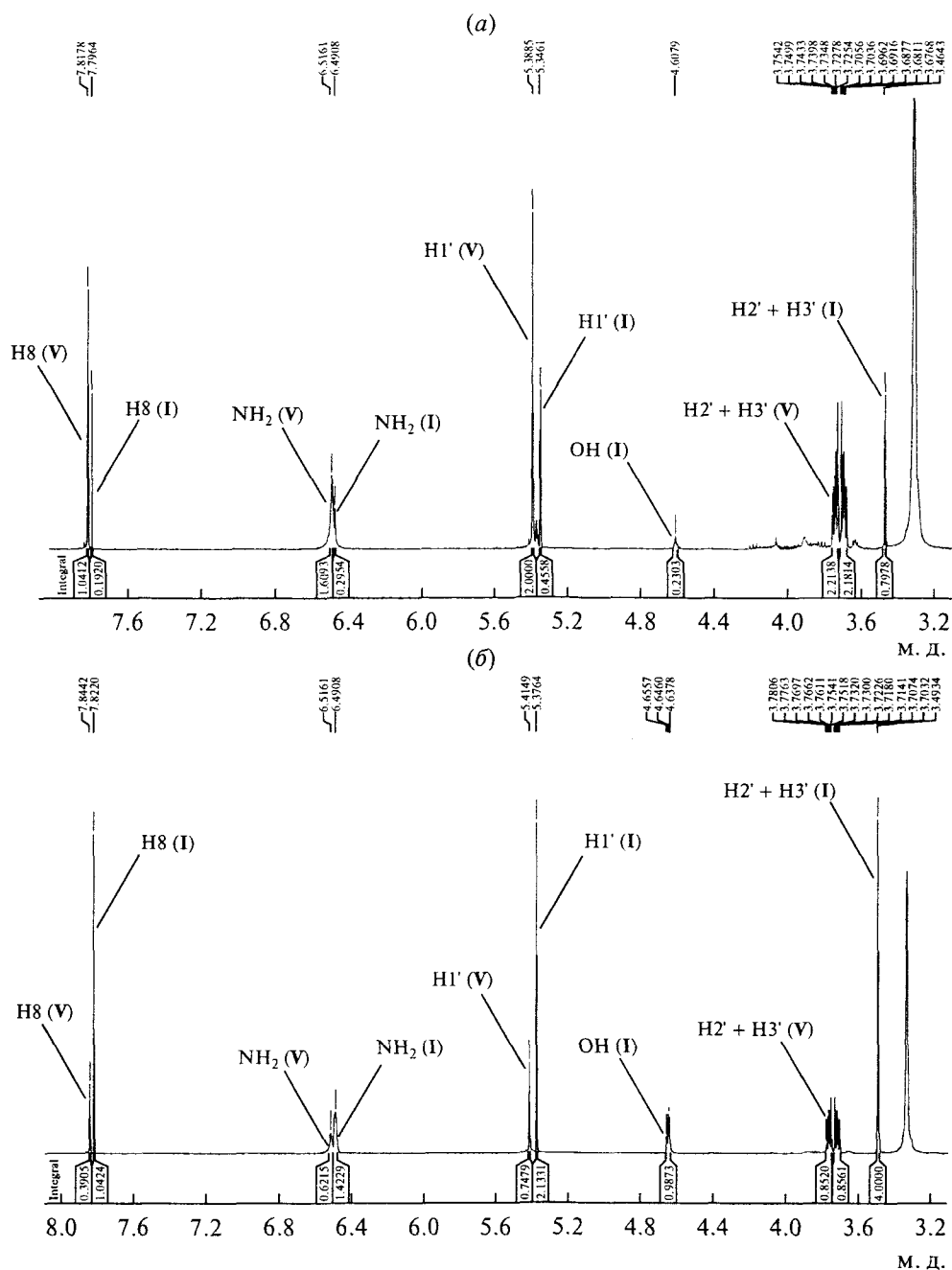
Так как метод В.С. Богачева [13] и его модификации не позволили получить целевые фосфорамидаты, мы вернулись к оптимизации метода, представленного на схеме 2.

Так, нами было изучено влияние температурного режима и продолжительности реакции ацикловира с хлорокисью фосфора на количество образующегося продукта (V). Для изучения влияния температурного режима реакцию проводили при +4 или –18°C в течение 4 ч, после чего анализировали реакционные смеси с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Однако ¹H-ЯМР-спектры представляли собой сложные, малоинформативные наборы сигналов, поэтому для оценки количества образующегося производного (V) мы использовали косвенный метод. Для этого реакционные смеси обрабатывали охлажденным до +4°C насыщенным раствором NaHCO₃, экстрагировали эфиром триэтилфосфат и водную фракцию хроматографировали на колонке с ионообменной смолой DEAE-Toyopearl. Ациклоvir и 9-(2-хлорэтоксиметил)гуанин (V) – неионные соединения, однако сорбируются носителем за счет их гидрофобности и поэтому должны элюироваться с колонки водно-органической смесью. Мы использовали в качестве элюента 15% водный ацетонитрил. Как видно из рисунка, проведение реакции при –18°C позволяет свести к минимуму хлорирование гидроксильной группы ацикловира (выход соединения (V) менее 5%), в то время как при +4°C выход соединения (V) составил 25–30%.

После отмывки колонки от неанионных соединений единственный продукт реакции – монофосфат ацикловира, элюировали в линейном градиенте концентраций NH₄HCO₃ (0 → 0.25 М). Следует отметить, что при проведении данной реакции при +4°C выход монофосфата ацикловира (IV) составил 46%, в то время как при –18°C его удалось повысить до 81%. Следует также отметить, что при –40°C фосфорилирование ацикловира не наблюдалось.

Увеличение времени проведения реакции не оказывало существенного влияния на образование продукта (V). Так, проведение реакции при –18°C в течение 4 и 6 ч приводило к сходному набору продуктов, причем основным продуктом реакции был монофосфат ацикловира с приблизительно одинаковым выходом (около 80%).

Мы также показали, что при обработке фосфодихлорида (II), образующегося в реакции ацикловира с хлорокисью фосфора при –18°C, большим избытком амина (как минимум десятикратный избыток) в водном диоксане целевые фосфорамидаты получить не удастся. Основным продуктом данной



¹H-ЯМР-спектры (DMSO-*d*₆) нейонных продуктов реакционной смеси взаимодействия ацикловира с хлорокисью фосфора после хроматографии на DEAE-Тоуорегал: (а) при +4, (б) при -18°С. На спектрах не показаны сигналы NH-группы гуанина, представляющие собой уширенные синглеты с химическими сдвигами 10.3–10.7 м.д.

реакции является фосфодиамидат ацикловира. Поэтому, для получения целевых соединений необходимо уменьшать количество амина. А в этом случае, для предотвращения закисления реакционной среды, необходимо использовать “протонную губку” [14]. В качестве “протонной губки” нами был выбран *N*-этилдиизопропиламин. Его выбор обусловлен тем, что он по сравнению с другими третичными аминами (триэтиламин, трибутиламин и др.)

лучше выполняет функцию захвата H⁺ [14]. Кроме этого, *N*-этилдиизопропиламин препятствует выводу из реакции диаминов, таких, как *N,N*-диметилендиамин и *N,N*-диметилпропилендиамин и снижает выход фосфодиамидатов. При его использовании не требуется 10–20-кратного избытка амина в реакционной среде и, кроме того, появляется возможность проведения реакций в растворителях, содержащих до 5% воды.

Таким образом, нами был подобран состав реагента для получения фосфоамидатов, представляющего смесь амина с *N*-этилдиизопропил-амином в мольном соотношении 1 : 2, растворенную в диоксане, содержащем 1% воды.

Исходя из вышесказанного, синтез фосфорамидатов ацикловира проводили следующим образом. Ацикловир (I) суспензировали в триэтилфосфате, охлаждали до -18°C и добавляли хлорокись фосфора. Образующийся фосфодихлоридат ацикловира (II) через 4 ч обрабатывали фосфорамидирующим реагентом (схема 2).

Структуры синтезированных соединений представлены в таблице. Благодаря данной оптимизации нам удалось получить фосфорамидаты с неплохими для ацикловира выходами. Так, при использовании вторичных аминов выход целевых фосфорамидов (X), (XII) и (XVI) составил 45, 41 и 48% соответственно, в то время как в случае первичных аминов выходы соединений (XI), (XIII)–(XV) составляли 10–15%. Основным продуктом реакции в этом случае был ацикловирмонофосфат (IV), что позволяет получать целевые фосфорамидаты данного типа в количествах, достаточных как для анализа, так и для противовирусных испытаний. Все синтезированные фосфорамидаты стабильны при $\text{pH} > 8$. В кислых средах происходит быстрый (около 5 мин) гидролиз фосфорамидатной связи, приводящий к образованию монофосфата ацикловира (IV).

Таким образом, нами оптимизирована схема синтеза фосфоамидатов ацикловира, которая позволяет получить целевые соединения в количествах, необходимых для биологических исследований.

Полученные фосфоамидаты (X)–(XVI) переданы на вирусологические испытания. По предварительным данным, ацикловирморфолинофосфат (X) и ацикловирдипропиламинофосфат (XII) показали умеренную активность против HSV-1 как дикого, так и ацикловиррезистентного штаммов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы морфолин, 2-морфолин-ноэтиламин, 3-диметиламино-1-пропиламин, гексиламин, *N*-этилдиизопропиламин, триэтиламин, трифторуксусный ангидрид, хлорокись фосфора (Fluka, Швейцария); *N,N*-диметиламин и дипропиламин (Aldrich, Германия), пирролидин и 30% водный аммиак (Acros, Бельгия). Используемые в работе растворители очищали по стандартным методикам.

Ход реакций контролировали с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: хлороформ–метанол, 4 : 1 (А); хлороформ–метанол–25% водный аммиак, 60 : 35 : 5 (Б); диоксан–25% водный аммиак, 4 : 1 (В).

Колоночную хроматографию осуществляли на анионообменной смоле DEAE-Toyopearl 650M

(Tosoh Corporation, Япония) и на обращенно-фазовом силикагеле LiChroprep RP-18 (40–63 мкм) (Merck, Германия).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC (США) в воде, в диапазоне от 200 до 300 нм.

ЯМР-спектры (δ , м.д., КССВ, Пц) регистрировали на спектрофотометре АМХИИ-400 (Bruker, США) с рабочей частотой 400 МГц для ^1H -ЯМР и 162 МГц для ^{31}P -ЯМР при температуре 27°C (с подавлением спин-спиновой фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота).

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, метилфосфат (III) и 9-(2-хлорэтоксиметил)гуанин (V). К суспензии ацикловира (44.0 мг, 0.2 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл), охлажденной до $+4^{\circ}\text{C}$, добавляли хлорокись фосфора (46.0 мг, 0.3 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 4 ч при $+4^{\circ}\text{C}$, обрабатывали водой (11.0 мг, 0.6 ммоль) и через 30 мин добавляли амин (2 ммоль) в метаноле (1 мл). Выдерживали 2 ч при $+4^{\circ}\text{C}$, нейтрализовали охлажденным до $+4^{\circ}\text{C}$ водным раствором насыщенного NaHCO_3 (10 мл) и экстрагировали эфиром. Водный слой хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl (20 × 175 мм), которую сначала промыли 15% водным ацетонитрилом, а затем элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Были получены две фракции, которые упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали. Фракцию 1, вышедшую в 15% водном ацетонитриле, хроматографировали на колонке RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 50%, 400 мл) в воде. Целевую фракцию упаривали, лиофилизировали из водного ацетонитрила и получали 14 мг (29%) соединения (V): R_f 0.46 (А), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9600). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 10.51 (1 H, уш.с, NH), 7.82 (1 H, с, H8), 6.49 (2 H, уш. с, NH_2), 5.39 (2 H, с, H1'), 3.68–3.75 (4 H, м, H2' + H3'). Фракцию 2, вышедшую в 0.07–0.10 М NH_4HCO_3 , повторно хроматографировали на колонке RP-18 (15 × 140 мм), элюировали 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, лиофилизировали из воды и получали 20 мг (30%) соединения (III): R_f 0.51 (В), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 249 нм (ϵ 10400). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.89 (1 H, с, H8), 5.48 (2 H, с, H1'), 3.89–3.93 (2 H, м, H3'), 3.71–3.74 (2 H, м, H2'), 3.46 (3 H, д, J 10.74, MeO). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 21.55 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, фосфат (IV). К суспензии ацикловира (0.5 г, 2.26 ммоль) в триэтилфосфате (10 мл), охлажденной до -18°C , добавляли хлорокись фосфора (0.52 г, 3.39 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 4 ч при -18°C , нейтрализовали охлажденным до $+4^{\circ}\text{C}$ водным раствором насыщенного NaHCO_3 (20 мл) и экстрагировали эфи-

ром. Водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Тоуорpearl (25 × 200 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 1000 мл). Целевую фракцию упаривали, переупаривали с водой (4 × 50 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (25 × 200 мм), элюировали 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, лиофилизировали из воды и получали 0.59 г (81%) соединения (IV) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.06 (Б), 0.35 (В). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 249 нм (ϵ 10200). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.86 (1 Н, с, Н8), 5.46 (2 Н, с, Н1'), 3.86–3.89 (2 Н, м, Н3'), 3.68–3.70 (2 Н, м, Н2'). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 2.27 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, дипирролидинфосфат (VI). К суспензии ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл), охлажденной до +4°C, добавляли хлорокись фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 4 ч при +4°C и обрабатывали пирролидином (156 мг, 2.2 ммоль) в диоксане (1 мл), содержащем 10 мкл воды. Выдерживали 2 ч при +4°C и экстрагировали эфиром, водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Тоуорpearl (20 × 175 мм). Фракцию, сошедшую в воде упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 40%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . По данным ЯМР-спектроскопии, продукт (VI) содержал примесь ацикловира (I) в количестве 50%. R_f 0.28 (А), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 249 нм (ϵ 9800). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.76 (1 Н, с, Н8), 5.48 (2 Н, с, Н1'), 3.99–4.04 (2 Н, м, Н3'), 3.75–3.78 (2 Н, м, Н2'), 2.86–3.12 (8 Н, м, CH_2NCH_2), 1.90–2.05 (8 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 19.95 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, диамидофосфат (VII). К суспензии ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл), охлажденной до +4°C, добавляли хлорокись фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 4 ч при +4°C и обрабатывали 30% водным аммиаком (150 мкл, 2.2 ммоль). Выдерживали 2 ч при +4°C и экстрагировали эфиром, водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Тоуорpearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, сошедшую в 0.03–0.06 М NH_4HCO_3 упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 40%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . По данным ЯМР-спектроскопии, продукт (VII) содержал примесь ацикловира (I) в количестве 25%. R_f 0.27 (Б), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 249 нм (ϵ 9900). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.88 (1 Н, с, Н8), 5.48 (2 Н, с, Н1'), 3.99–

4.03 (2 Н, м, Н3'), 3.75–3.77 (2 Н, м, Н2'). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 21.55 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, морфолинофосфат (X). К суспензии ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл), охлажденной до –18°C, добавляли хлорокись фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 4 ч при –18°C, обрабатывали смесью морфолина (57.5 мг, 0.66 ммоль) и *N*-этилдизопропиламина (170.5 мг, 1.32 ммоль) в диоксане, содержащем 1% воды (1 мл). Выдерживали 2 ч при +4°C, нейтрализовали охлажденным (до +4°C) водным раствором насыщенного NaHCO_3 (10 мл) и экстрагировали эфиром. Водный экстракт хроматографировали на колонке с DEAE-Тоуорpearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Целевую фракцию упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 30%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Фракцию с целевым продуктом упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 40 мг (45%) соединения (X) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.21 (Б). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 10200). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.90 (1 Н, с, Н8), 5.47 (2 Н, с, Н1'), 3.83–3.87 (2 Н, м, Н3'), 3.70–3.73 (2 Н, м, Н2'), 3.52 (4 Н, т, J 4.40, CH_2OCH_2), 2.84 (4 Н, дт, J 4.40 и 4.80, CH_2NCH_2). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 8.18 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, *N*-морфолиноэтиламинофосфат (XI) был получен аналогично фосфорамидату (X) из ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль), хлорокиси фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль) и 2-морфолиноэтиламина (86.0 мг, 0.66 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Тоуорpearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 30%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 11.5 мг (12%) соединения (XI) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.23 (А). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9800). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.79 (1 Н, с, Н8), 5.34 (2 Н, с, Н1'), 3.86–3.89 (2 Н, м, Н3'), 3.81 (4 Н, уш.с, CH_2OCH_2), 3.73–3.75 (2 Н, м, Н2'), 2.92–2.98 (6 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} + \text{CH}_2\text{NCH}_2$), 2.81–2.87 (2 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 9.26 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, дипропиламинофосфат (XII) был получен аналогично (X) из ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль), хлорокиси фосфо-

ра (51.0 мг, 0.33 ммоль) и дипропиламина (66.9 мг, 0.66 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 30%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 36.5 мг (41%) соединения (XII) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.30 (Б). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 249 нм (ϵ 10000). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.91 (1 Н, с, Н8), 5.48 (2 Н, с, Н1'), 3.77–3.81 (2 Н, м, Н3'), 3.71–3.73 (2 Н, м, Н2'), 2.63–2.70 (4 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.26–1.36 (4 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.71 (6 Н, т, J 7.48, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 10.76 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, *N,N*-диметиламиноэтиламинофосфат (XIII). Целевой продукт был получен аналогично (X) из ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль), хлорокиси фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль) и *N,N*-диметиламина (58.2 мг, 0.66 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 30%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 8.8 мг (10%) соединения (XIII) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.19 (А). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9700). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.79 (1 Н, с, Н8), 5.34 (2 Н, с, Н1'), 3.92–3.96 (2 Н, м, Н3'), 3.68–3.72 (2 Н, м, Н2'), 3.22 (2 Н, т, J 6.08, $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.80 (2 Н, т, J 6.08, $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.68 (6 Н, с, CH_3N). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 10.86 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, 3-диметиламино-1-пропиламинофосфат (XIV) был получен аналогично (X) из ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль), хлорокиси фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль) и 3-диметиламино-1-пропиламина (67.5 мг, 0.66 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения, упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 30%, 400 мл) в 0.05 М

NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 9.8 мг (11%) соединения (XIV) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.24 (Б). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9600). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.79 (1 Н, с, Н8), 5.34 (2 Н, с, Н1'), 3.92–3.96 (2 Н, м, Н3'), 3.68–3.72 (2 Н, м, Н2'), 3.65–3.69 (2 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.00 (2 Н, т, J 6.78, $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.73 (6 Н, с, CH_3N), 1.71–1.79 (2 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 10.55 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, гексиламинофосфат (XV) был получен аналогично (X) из ацикловира (50.0 мг, 0.22 ммоль), хлорокиси фосфора (51.0 мг, 0.33 ммоль) и гексиламина (67.0 мг, 0.66 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 50%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 15 мг (17%) соединения (XV) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.32 (Б), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9700). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.92 (1 Н, с, Н8), 5.49 (2 Н, с, Н1'), 3.84–3.89 (2 Н, м, Н3'), 3.71–3.74 (2 Н, м, Н2'), 2.56–2.62 (2 Н, м, CH_2NH), 1.22–1.29 (4 Н, м, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.07–1.13 (4 Н, м, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 0.77 (3 Н, т, J 7.32, CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 8.56 с.

9-(2-Гидроксиэтоксиметил)гуанин, пирролидиниламинофосфат (XVI) был получен аналогично (X) из ацикловира (60.0 мг, 0.266 ммоль), хлорокиси фосфора (61.3 мг, 0.4 ммоль) и пирролидина (57.0 мг, 0.8 ммоль). Реакционную смесь экстрагировали эфиром и водную фракцию хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl (20 × 175 мм), элюировали в линейном градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракцию, содержащую заряженные соединения упаривали, переупаривали с водой (2 × 30 мл) и повторно хроматографировали на RP-18 (15 × 140 мм), элюировали в линейном градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 50%, 400 мл) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Целевую фракцию упаривали, переупаривали, лиофилизировали из воды и получали 48 мг (48%) соединения (XVI) (в NH_4^+ -форме): R_f 0.30 (Б), УФ-спектр (H_2O): λ_{max} 250 нм (ϵ 9700). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.91 (1 Н, с, Н8), 5.49 (2 Н, с, Н1'), 3.84–3.89 (2 Н, м, Н3'), 3.70–3.73 (2 Н, м, Н2'), 2.84–2.89 (4 Н, м, $2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.62–1.66 (4 Н, м, $2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 9.06 с.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума Российской академии наук (программа “Молекулярная и клеточная биология”) и РФФИ (грант № 10-04-00914). Авторы выражают благодарность В.Л. Андроновой и Г.А. Галегову (Институт вирусологии им. Ивановского РАМН) за проведение вирусологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zemlicka J.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1587. P. 276–286.
2. *Cahard D., McGuigan C., Balzarini J.* // *Mini. Rev. Med. Chem.* 2004. V. 4. P. 371–381.
3. *Congiati C., McGuigan C., Jiang W.G., Davies G., Mason M.D.* // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2005. V. 24. P. 485–489.
4. *McGuigan C., Cahard D., Sheeka H.M., De Clercq E., Balzarini J.* // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 1748–1753.
5. *McGuigan C., Harris S.A., Daluge S.M., Gudmundsson K.S., McLean E.W., Burnette T.C., Marr H., Hazen R., Con-dreay L.D., Johnson L., De Clercq E., Balzarini J.* // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 3504–3515.
6. *Perrone P., Luoni G.M., Kelleher M.R., Daverio F., Angell A., Mulready S., Congiati C., Rajyaguru S., Martin J.A., Le Pogam S., Najera I., Klumpp K., Smith D.B., McGuigan C.* // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. P. 1840–1849.
7. *De Clercq E.* // *J. Clin. Virol.* 2001. V. 22. P. 73–89.
8. *McGuigan C., Derudas M., Bugert J.J., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. P. 4364–4367.
9. *Покровский А.Г., Проняева Т.Р., Федюк Н.В., Шипицын А.В., Широкова Е.А., Закирова Н.Ф.* // Патент № RU 2243972 C1 от 10.01.2005.
10. *Shipitsyn A.V., Zakirova N.F., Belanov E.F., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Kukhanova M.K., Pokrovsky A.G.* // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2003. V. 22. P. 963–966.
11. *Варламова Т.Б., Колодкина И.И., Юркевич А.М.* // *Хим.-фарм. журн.* 1989. Т. 23. С. 1371–1374.
12. *Tedder J.M.* // *Chem. Rev.* 1955. V. 55. P. 787–827.
13. *Богачев В.С.* // *Биоорган. химия.* 1995. Т. 21. С. 212–217.
14. *Carpino L.A., El-Faham A.* // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 695–698.

Phosphoramidate Derivatives of Acyclovir – Herpes Virus Replication Inhibitors

N. F. Zakirova, A. V. Shipitsyn*, M. V. Jasko, and S. N. Kochetkov

*Phone: +7 (495) 135-60-65; fax: +7 (499) 135-14-05; e-mail: alex_chip@email.ru

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilov St., 32, 119991 Moscow, Russia

A number of new phosphoramidates of acyclovir – compounds of interest as anti-virals against resistant strains of virus herpes was synthesized. Several methods of synthesis of these compounds were suggested. Optimal method appeared to be the obtaining of phosphoramidates through the phosphomonochloride with its subsequent treatment with various amines. Two compounds have shown moderate activity against HSV-1.

Keywords: acyclovir, herpes virus, phosphoramidates.