



УДК 547.963.32.057

© 1990 г.

*С. В. Кочеткова, Т. Л. Цилевич, Г. В. Владыко\*,  
Л. В. Коробченко\*, Е. И. Бореко\*, И. П. Смирнов,  
А. А. Хорлин, Б. П. Готтих, В. Л. Флорентьев*

## СОЕДИНЕНИЯ, ПОДОБНЫЕ АЦИКЛОВИРУ VII\*. ПОПЫТКА КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА (6-ГИДРОКСИ-2-ОКСА-4-ГЕКСЕНИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ)

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;  
\*Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР, Минск*

В рамках модели, основанной на известных к настоящему времени данных по механизму действия ацикловира, сделана попытка оценить перспективность 6-гидрокси-2-окса-4-гексенильных производных нуклеиновых оснований в качестве противогерпетических препаратов. Показана высокая вероятность противогерпетической активности 9-(6-гидрокси-2-окса-4-гексенил)гуанина. Синтезированы 6-гидрокси-2-окса-4-гексенильные производные аденина, гуанина, цитозина, тимина, урацила, 1,2,4-триазол-3- и 1,2,4-триазол-5-карбоксамиды. Изучена противовирусная активность полученных соединений, и показано, что производное гуанина обладает достаточно высокой активностью (химиотерапевтический индекс 8) против вируса герпеса простого типа 1.

К настоящему времени синтезировано огромное число ациклических аналогов нуклеозидов, однако лишь единичные соединения из этого множества оказались достаточно активными, чтобы использовать их в качестве противовирусных препаратов. Создалась тушковая ситуация, когда дальнейшие исследования в этой области уже не представляют самостоятельного интереса (следует отметить, что, за редчайшим исключением, химики, работающие в области синтеза ациклонуклеозидов, не создавали новых знаний, а использовали знания из смежных областей органической химии). Становится все более очевидным, что дальнейшие практические успехи в области поиска противовирусных препаратов в ряду ациклонуклеозидов связаны с созданием и разработкой модели, позволяющей до начала синтетических исследований оценить перспективность данного соединения с точки зрения его противовирусной активности или по крайней мере предсказать, какие соединения не могут проявлять противовирусную активность в рамках использованной модели. В настоящем сообщении сделана попытка сформулировать модель предварительного, досинтетического отбора противогерпетических препаратов и изучена применимость этой модели на примере 6-гидрокси-2-окса-4-гексенильных производных нуклеиновых оснований.

Предлагаемая модель базируется на относительно хорошо изученном к настоящему времени механизме противовирусной активности ацикловира [2—4]:

- 1) рассматриваются лишь геометрические особенности исследуемого соединения,
- 2) «действующей» формой препарата является его трифосфат [5, 6],
- 3) мишенью «действующей» формы препарата является кодируемая вирусом ДНК-полимераза,

\* Предыдущее сообщение см. [1]. Корреспонденцию просим направлять В. Л. Флорентьеву.

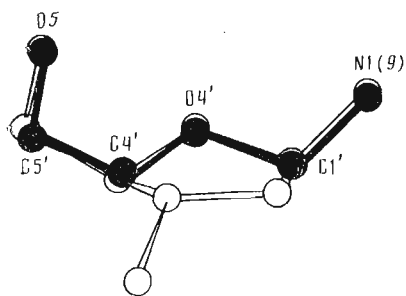


Рис. 1

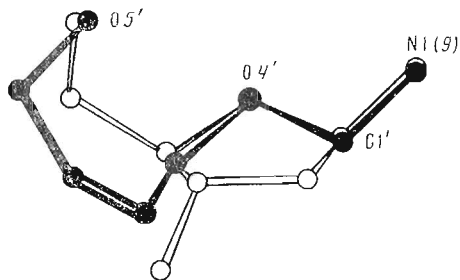


Рис. 3

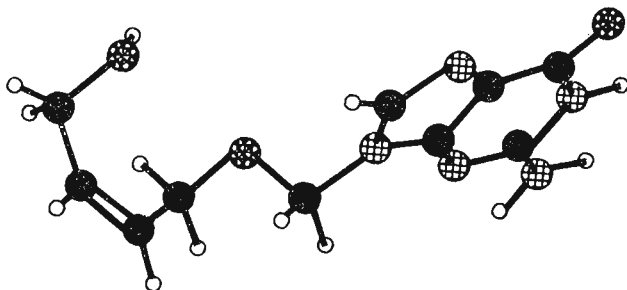


Рис. 2

Рис. 1. Конформер ацикловира (темные элементы,  $\Delta E = 0,24$  ккал/моль) в сравнении с «активной» структурой (светлые элементы)

Рис. 2. Наиболее близкий к «активной» структуре конформер 9-(6-гидроксип-2-окса-4-гексенил)гуанина ( $\Delta E = 0,26$  ккал/моль)

Рис. 3. Конформер 9-(6-гидрокси-2-окса-4-гексенил)гуанина после «стягивания» функционально важных атомов (темные элементы,  $\Delta E = 0,38$  ккал/моль) в сравнении с «активной» структурой (светлые элементы)

4) в переходном состоянии полимеразной реакции на вирусоспецифической ДНК-полимеразе дезоксирибозный цикл субстрата принимает  $O4'$ -эндо-конформацию. В пользу такого предположения может служить сходство одной из стабильных конформаций ацикловира с конформацией нуклеозида с  $O4'$ -эндо-сахаром (рис. 1),

5) основными точками связывания субстрата в активном центре ДНК-полимеразы являются нуклеиновое основание, кислородный атом рибозного цикла и  $\alpha$ -фосфатная группа.

Таким образом, в первом приближении задача сводится к поиску относительно стабильного конформера изучаемого аналога, функционально значимые атомы и группы которого совпадали бы в пространстве с соответствующими атомами переходного состояния полимеразной реакции. Основы такого подхода были разработаны нами ранее [7].

Здесь следует сделать два важных замечания.

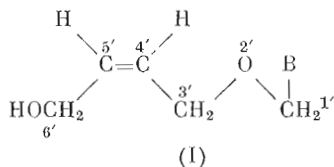
Во-первых, конкретизировать понятие «относительная стабильность». Поскольку при температурах, близких к комнатной, константа равновесия уменьшается приблизительно в 10 раз при повышении энергии состояния на 1,4 ккал/моль, эта величина была выбрана в качестве граничной энергии. Другими словами, мы рассматривали лишь те конформеры ациклонуклеозида, которые превышали по энергии конформер, соответствующий глобальному минимуму энергии, не более чем на 1,4 ккал/моль.

Во-вторых, конкретизировать те точки структуры аналога, которые определяют сходство конформера с «активной» конформацией. Как было показано с помощью ЯМР [8], для ациклических аналогов нуклеозидов в растворе характерно «свободное» вращение вокруг всех ординарных связей, причем все возможные ротамеры присутствуют в равновесной смеси в сравнимых количествах. Учитывая эту конформационную особенность ациклонуклеозидов, мы ограничились сравнением структур по положению

лишь четырех атомов: N1(9), C1' (положение связи C1'—N1(9) определяет положение нуклеинового основания), O4' (одна из точек связывания) и O5' (определяет положение  $\alpha$ -фосфата).

Теоретический конформационный анализ ациклонуклеозидов проводили методом силового поля с параметрами из работы [9]. Потенциальную энергию конформеров представляли как сумму ван-дер-ваальсовой и торсионной энергии. В качестве «активной» структуры использовали O4-*эндо*-конформер 2-дезоксигуанозин-5'-фосфата (фрагмент рентгеновской структуры 2'-дезоксигуанозин-5'-фосфата [10]). Сравнение конформеров ациклонуклеозидов с «активной» структурой проводили, минимизируя сумму расстояний от N1(9)-, C1'-, O4'- и O5'-атомов «активной» структуры до соответствующих атомов конформера. На первом этапе конформер рассматривали как жесткую конструкцию. По достижении наилучшего соответствия снимали ограничения на изменение двугранных углов у конформера ациклонуклеозида (разрешали только вращение вокруг ординарных связей) и «стягивали» попарно структурно важные атомы двух структур, после чего рассчитывали повышение энергии конформера ациклонуклеозида за счет изменения торсионных углов.

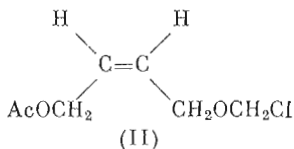
В качестве объектов исследования были выбраны (Z)-6-гидрокси-2-окса-4-гексенильные производные нуклеиновых оснований:



В = тимидил-1 (а), урацил-1 (б), цитозин-1 (в), аденил-9 (г), гуанил-9 (д), 3-карбоксамидо-1,2,4-триазол-1 (е), 5-карбоксамидо-1,2,4-триазол-1 (ж).

Такой выбор определялся тем, что эти соединения, с одной стороны, принципиально отличаются от ацикловира химической структурой, с другой — обладают функционально важными группами (гидрокси- и эфирный кислород), и, как показывают данные конформационного расчета, один из относительно стабильных конформеров (см. рис. 2) по рассмотренным выше критериям весьма близок к «активной» конформации (табл. 1 и рис. 3). Таким образом, можно было ожидать, что изучение противовирусной активности этих ациклонуклеозидов позволит сделать разумные предположения о соотношении «химического» и «геометрического» факторов и предварительные выводы о пространственных ограничениях вирусоспецифических ферментов.

Бутенил-оксиметильные производные нуклеиновых оснований (Ia—ж) были синтезированы с использованием в качестве алкилирующего агента (Z)-1-хлор-6-ацетокси-2-окса-4-гексена (II):



Взаимодействие хлорида (II) с триметилсилильными производными тимина, урацила или цитозина или с натриевыми солями аденина или этилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты приводило к 6-ацетокси-2-окса-4-гексенильным производным соответствующих нуклеиновых оснований, которые без выделения подвергали аммонолизу для удаления ацетильной группы и образования карбоксамидной группы в последнем случае. Производное гуанина (Iд) синтезировали по разработанному ранее методу [11]. Выходы и физико-химические характеристики соединений (Ia—ж) представлены в табл. 2.

Строение ациклонуклеозидов было подтверждено УФ- и ПМР-спектрами (табл. 3 и 4). Химические сдвиги и мультиплетность сигналов в спектрах ПМР полностью соответствуют ожидаемым для синтезированных соединений.

Параметры наиболее близкого к «активной» структуре конформера  
6-гидрокси-2-окса-4-гексенильных производных нуклеиновых оснований

Двугранный угол, град				$\Delta E^*$ , ккал/моль
N3—C1'—O2'—C3'	C1'—O2'—C3'—C4'	O2'—C3'—C4'—C5'	C4'—C5'—C6'—O6'	
178	64	86	-59	0,26

\* Разность потенциальных энергий конформера и глобального минимума.

Таблица 2

Выходы, условия реакции и свойства ациклических аналогов

Продукт реакции	Температура реакции, °С (время, ч)	Средняя элюирующая концентрация этанола, %	Выход, %	Т. пл., °С
(Ia)	84(6)	5	53	79-81
(Iб)	84(6)	7	56	97-98
(Iв)	84(6)	35	50	142-144
(Iг)	20(20)	22	26	180-182
(Iд)	84(10)	45	32	>300 (разл.)
(Iе)	20(24)	20	11	118-120
(Iж)	20(24)	10	21	87-89

Таблица 3

УФ-спектры ациклических аналогов нуклеозидов

Соединение	$\lambda_{\max}$ , нм ( $\epsilon \cdot 10^{-3}$ , $M^{-1} \cdot CM^{-1}$ )		
	pH 7	pH 13	pH 1
(Ia)	262(9,2)	262(7,3)	262(9,2)
(Iб)	256(9,9)	255(7,5)	256(10,4)
(Iв)	264(7,9)	264(7,8)	274(11,7)
(Iг)	257(15,0)	257(15,2)	262(15,0)
(Iд)	247(12,5)	260(10,4)	253(11,8)
(Iе) *	196(13,0)		
(Iж) *	192(11,2)		
	214 ** (8,5)		

\* Спектр снят в воде.

\*\* Перегиб спектральной кривой.

Противовирусные свойства ациклических аналогов нуклеозидов определяли в культурах тканей в отношении вирусов герпеса простого типа 1 (1С), осповакцины, классической чумы птиц (Росток H7N1), респираторно-синтициального (Lонг), везикулярного стоматита (Индiana), венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ-230) и ЕСНО-6. Как видно из табл. 5, среди 7 исследованных соединений только одно показало наиболее выраженную противовирусную активность в экспериментах с вирусом герпеса простого.

Полученные результаты удовлетворительно совпадают с предсказаниями, сделанными в рамках рассматриваемой модели. Очевидно, что это совпадение может быть случайным и его нельзя рассматривать как доказательство адекватности модели изучаемому явлению. Строго говоря, полученные результаты указывают лишь на то, что дальнейшие исследования в выбранном направлении имеют смысл. Если все-таки предположить, что выявленное совпадение предсказания модели и экспериментальных результатов не случайно (окончательный ответ на этот вопрос можно получить только с помощью дальнейших экспериментов), то можно сделать некоторые предварительные выводы:

Спектры ПМР (в DMSO-d<sub>6</sub>) ациклических аналогов нуклеозидов

Соединение	δ, м.д. (RCCB, Гц)					
	1'-CH <sub>2</sub> (с)	3'-CH <sub>2</sub>	4'-CH и 5'-CH (м)	6'-CH <sub>2</sub>	Аромат. протоны	Амино-, имино- и амидопротоны
(Ia) *	5,11	4,15д (6)	5,59	4,04д	7,58к (1,7)	10,07с (3-NH)
(Iб)	5,13	4,15д (6)	5,61	4,03д	7,69д 5,68д (8)	10,14с (3-NH)
(Iв)	5,10	4,15д (6)	5,58	4,05д	7,62д 5,75д (7,6)	7,20с (4-NH <sub>2</sub> )
(Iг)	5,59	4,17м	5,59	3,99м	8,27с 8,20с	7,25с (6-NH <sub>2</sub> )
(Iд)	5,39	4,14д (6)	5,57	4,01д	7,83с	10,50с (1-NH) 6,52с (2-NH <sub>2</sub> )
(Iе)	5,63	4,19м	5,63	4,02м	8,80с	7,82с и 7,61с (3-CONH <sub>2</sub> )
(Iж)	5,94	4,20м	5,59	4,02м	8,17с	8,21с и 7,99с (5-CONH <sub>2</sub> )

\* Сигнал 5-CH<sub>3</sub> при 1,86 м.д.

Таблица 5

## Противовирусные свойства ациклических аналогов нуклеозидов \*

Соединение	Вирус *	Диаметр зоны при исследовании методом «скрининг-тест», мм		Исследование методом редукции бляшек			
		Токсичности	Подавления образования бляшек	Концентрация препарата **, мкг/мл	Титр вируса, lg БОЕ/мл	Разность с контролем, lg БОЕ/мл	ХТИ
(Iг)	ВЭЛ	0	14	100	≤7,0	≥1,50	1
				50	8,08	0,42	
				25	8,18	0,32	
				0	8,50	—	
(Iд)	ВЭЛ	0	14	100	≤7,0	≥1,50	1
				50	8,34	0,16	
				25	8,46	0,04	
				0	8,50	—	
(Iд)	ВОВ	0	16	100	≤3,2	≥1,62	2
				50	≤3,2	≥1,62	
				25	4,56	0,27	
				0	4,82	—	
(Iе)	ВОВ	0	12	400	≤3,0	≥1,50	1
				200	4,23	0,27	
				100	4,34	0,16	
				0	4,50	—	
(Iв)	ВОВ	0	18	400	≤3,0	≥1,5	1
				200	4,28	0,22	
				100	4,43	0,07	
				0	4,50	—	
(Iд)	ВГП	0	16	100	≤4,0	≥1,61	8
				50	≤4,0	≥1,61	
				25	≤4,0	≥1,61	
				12	≤4,0	≥1,61	
				6	4,9	0,71	
				0	5,61	—	

\* Сокращения: ВОВ — вирус осповакцины; ВГП — вирус герпеса простого; ВЭЛ — вирус энцефаломиелита лошадей; БОЕ — бляшкообразующие единицы; ХТИ — химиотерапевтический индекс.

\*\* В верхней строке для каждого соединения приведена максимальная переносимая концентрация.

1) в случае ациклонуклеозидов «геометрический» фактор играет основополагающую роль в проявлении противогерпесной активности;

2) аналог входит в активный центр фермента-мишени эфирным кислотом, причем фрагмент аналога  $C3'-C4'=C5'-C6'$  не испытывает заметных пространственных ограничений со стороны активного центра.

### Экспериментальная часть

Спектры ПМР записывали на спектрометре XL-100 (Varian, США). УФ-спектры снимали на приборе Ultrospec (ЛКВ, Швеция). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol UV 254 (ЧСФР), проявляя либо смесью  $EtOH-CHCl_3$  (20% этанола), либо смесью изопропанол—аммиак—вода (7 : 2 : 1). Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 (ЧСФР). Смесью, полученную из 10 ммоль нуклеинового основания, разделяли на колонке размером  $3 \times 16$  см. Элюировали хлороформом или смесью этанола с хлороформом (линейный градиент концентрации этанола от 0% до элюирующей концентрации + 15% общим объемом 1 л; средние элюирующие концентрации этанола приведены в табл. 2). Элементный анализ синтезированных соединений отличался от рассчитанного не более чем на 0,2%.

*1-Хлор-6-ацетокси-2-окса-4-гексен (II)*. К раствору 10 г (0,1 моль) цис-4,7-дигидро-1,3-диоксепина в 10 мл сухого пентана при перемешивании добавляли несколько кристалликов прокаленного  $ZnCl_2$ , а затем медленно, по каплям, 11,8 г (0,15 моль) ацетилхлорида. Реакционную смесь перемешивали еще 1 ч при 20° С, растворитель и избыток ацетилхлорида упаривали в вакууме, а остаток растворяли в 50 мл хлороформа. Полученный раствор быстро промывали 20 мл ледяной воды, сушили безводным  $Na_2SO_4$  и фильтровали. После удаления растворителя остаток перегоняли в вакууме. Выход хлорида (II) 44%, т. кип. 78—80° С при 2 мм рт. ст. ПМР ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , м. д.: 5,65 (м, 2H, H4 и H5), 5,42 (с, 2H, 1- $CH_2$ ), 4,58 (д, 2H, 3- $CH_2$ ), 4,25 (д, 2H, 6- $CH_2$ ), 2,0 (с, 3H,  $CH_3$ ).

*6-Гидрокси-2-окса-4-гексенильные производные цитозина (Ia), тимина (Iб), урацила (Iв), гуанина (Iд)*. К суспензии 10 ммоль соответствующего нуклеинового основания в 10 мл гексаметилдисилазана добавляли 100 мг  $(NH_4)_2SO_4$ . Смесью кипятили 4—5 ч в случае тимина; урацила и цитозина и 12—14 ч в случае гуанина. Избыток гексаметилдисилазана отгоняли в вакууме. Остаток растворяли в 25 мл сухого дихлорэтана. К полученному раствору прибавляли 15 ммоль хлорида (II) и либо оставляли при ~20° С и перемешивании, либо кипятили (условия реакции приведены в табл. 2). Растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 50 мл 50% водного этанола, кипятили 10 мин и упаривали досуха. Остаток переупаривали с абс. этанолом ( $3 \times 20$  мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем. Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель упаривали в вакууме и остаток кристаллизовали из этанола. Выходы, средние элюирующие концентрации и температуры плавления приведены в табл. 2, данные УФ-спектров — в табл. 3, ПМР-спектров — в табл. 4, испытаний противовирусной активности — в табл. 5.

*6-Гидрокси-2-окса-4-гексенильные производные аденина (Iг) и амидов 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (Iе, ж)*. К суспензии 10 ммоль аденина или этилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты в 40 мл сухого диметилформамида добавляли порциями 0,45 г (15 ммоль) 80% суспензии  $NaNH$  в вазелиновом масле. Смесью перемешивали до прекращения выделения водорода. Затем добавляли 15 ммоль хлорида (II) и реакционную смесь перемешивали 24 ч при ~20° С. Осадок отделяли, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 50 мл насыщенного раствора  $NaHCO_3$ , промывали гексаном ( $1 \times 20$  мл), экстрагировали хлороформом ( $4 \times 50$  мл). Хлороформные экстракты сушили  $Na_2SO_4$ , растворитель упаривали. К остатку прибавляли 50 мл полунасыщенного при 0° С метанольного раствора аммиака, выдерживали при ~20° С в течение 2 сут, после чего растворитель упаривали, а остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Продукты перекристаллизовывали из этанола.

Выходы, средние элюирующие концентрации этанола и температуры плавления приведены в табл. 2, данные УФ- и ПМР-спектров — в табл. 3 и 4, результаты вирусологических исследований — в табл. 5.

Противовирусную активность соединений определяли методами «скрининг-тест» и редукции бляшек под агаровым покрытием. С вирусом ЕСНО исследования выполняли на монослойных культурах пассируемых кожно-мышечных клеток эмбриона человека, с респираторно-синтициальным вирусом — на перевиваемых клетках легкого кролика (RL-33), с остальными вирусами — на первично-трипсицинизированных фибробластах эмбрионов кур.

Критериями противовирусной активности считали наличие зоны подавления образования бляшек при исследовании методом «скрининг-тест» и снижения титра вируса в сравнении с необработанным контролем. Химотерапевтический индекс рассчитывали как отношение максимальной концентрации, переносимой тканевой культурой, к минимальной активной концентрации, обеспечивающей снижение титра вируса на величину, соответствующую  $1,25 \lg$  БОЕ/мл. Подробно методика исследования и оценки получаемых результатов описана ранее [12].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнов И. П., Кочеткова С. В., Цилевич Т. Л., Хорлин А. А., Готтих Б. П., Флорентьев В. Л. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1355—1361.
2. Elion G. B., Furman P. A., Fyfe J. A., de Miranda P., Beauchamp L., Schaefer H. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 23. P. 5716—5721.
3. Furman P. A., St. Clair M. H., Fyfe J. A., Rideout J. L., Keller P. M., Elion G. B. // J. Virol. 1979. V. 32. № 1. P. 72—84.
4. Elion G. B. // Adv. Enzyme Regul. 1980. V. 18. № 1. P. 53—61.
5. Elion G. B. // Amer. J. Med. 1982. V. 73. № 1. P. 7—13.
6. Keller P. M., Fyfe J. A., Beauchamp L., Lubbers C. M., Furman P. A., Schaefer H. J., Elion G. B. // Biochem. Pharm. 1981. V. 30. № 22. P. 3071—3077.
7. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. // Молекулярн. биология. 1975. № 1. С. 121—124.
8. Stolarski R., Lassota P., Kazimierczuk Z., Shugar D. // Z. Naturforsch. 1988. B. 43. с. № 2. S. 231—242.
9. Журкин В. Б., Полтев В. И., Флорентьев В. Л. // Молекулярн. биология. 1980. Т. 14. № 5. С. 1116—1130.
10. Seshadri T. P., Vismamitra M. A. // Pramāna. 1974. V. 3. № 4. P. 218—235.
11. Кочеткова С. В., Хорлин А. А., Смирнов И. П., Щавелева И. Л., Цилевич Т. Л., Готтих Б. П., Флорентьев В. Л. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 133—135.
12. Вотяков В. И., Бореко Е. И., Владыко Г. В., Карачо Н. И., Галегов Г. А., Леонтьева Н. А. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений. Минск, 1986.

Поступила в редакцию  
15.XII.1989

После доработки  
15.III.1990

S. V. KOCHETKOVA, T. L. TSILEVICH, G. V. VLADYKO\*,  
L. V. KOROVCHENKO\*, E. I. BOREKO\*, I. P. SMIRNOV, A. A. KHORLIN,  
B. P. GOTTIKH, V. L. FLORENTIEV

#### COMPOUNDS RELATED TO ACYCLOVIR. VII. AN APPROACH TO DESIGNING AN ANTIHERPETIC AGENT (6-HYDROXY-2-OXAHEXEN-4-YL DERIVATIVE OF NUCLEIC BASES)

V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow; \*Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry of the  
Byelorussian SSR, Minsk

Based on the available data on the acyclovir's mechanism of action we attempted to predict the antiherpetic activity of 6-hydroxy-2-oxahexen-4-yl derivatives of nucleic bases. In terms of this model 9-(6-hydroxy-2-oxahexen-4-yl) guanine might be active. 6-Hydroxy-2-oxahexen-4-yl derivatives of adenine, guanine, cytosine, thymine, uracile, 1,2,4-triazole-3 and 1,2,4-triazole-5-carboxamide have been synthesized and their activity against herpes virus I investigated. The guanine derivative proved to possess rather high activity (chemotherapeutical index 8).