



УДК 577.113.3.017

## СИНТЕЗ И АНТИГЕРПЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ АЦИКЛОВИРА

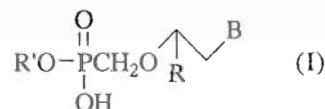
© 1997 г. Г. А. Галегов<sup>#</sup>, В. М. Шобухов, Н. А. Леонтьева, М. В. Ясько\*  
Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16;  
\* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва  
Поступила в редакцию 11.02.97 г. Принята к печати 20.05.97 г.

Осуществлен синтез фосфита и фторфосфата 9-(гидроксиэтилоксиметил)гуанина (ацикловира). Фосфит был получен обработкой ацикловира треххлористым фосфором в триэтилфосфате; для конденсации ацикловира с фторфосфорной кислотой использовали 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид. Соединения охарактеризованы <sup>1</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР-, а также масс-спектрами. Показано, что они обладают способностью селективно подавлять репродукцию вируса герпеса простого, тип 1, в культуре клеток Vero, причем в случае фосфита ацикловира наблюдается значительная активность и в отношении штамма вируса герпеса, резистентного к ацикловиру.

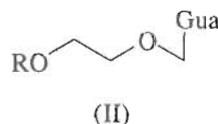
*Ключевые слова:* ациклические аналоги нуклеотидов; вирус герпеса простого; ацикловир.

В 80-х годах было показано, что ряд негидролизуемых ферментами фосфонатов ациклических нуклеозидов типа (Ia) обладают высокой антивирусной, в том числе и антигерпесной, активностью [1]. Это дало возможность создать препараты против многократно описанных штаммов вирусов герпеса, мутантных по тимидинкиназе и, таким образом, резистентных к известному противогерпесному препарату ацикловиру (ациклогуанозину) [2]. Однако такие соединения, превращаясь в соответствующие β,γ-дифосфатные производные (Iб) за счет фосфорилирования клеточными ферментами [3], значительно теряли в селективности по отношению к клеткам, инфицированным вирусом герпеса, так как они ингибировали также и биосинтез клеточной ДНК в неинфицированных клетках. В то же время ацикловир (IIa), фосфорилируясь только в инфицированных вирусом герпеса клетках в трифосфатное производное (IIб) [4, 5], не только подавляет репродукцию этого вируса, но и при достаточно высоких концентрациях селективно убивает инфицированные вирусом клетки. С целью поиска производных ацикловира, также активных по отношению к мутантным штаммам вирусов герпеса и лишенных недостат-

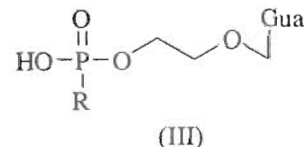
ков фосфонатов ациклических нуклеозидов (I), нами синтезированы и исследованы фосфорные эфиры ацикловира, которые содержат фосфитную (соединение (IIIa)) и фторфосфатную (соединение (IIIб)) группы.



R = H, CH<sub>2</sub>OH и др.,  
B = Ade, Cyt, 2,4-диаминопурин-9-ил,  
(Ia) R' = H; (Iб) R' = H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>



(IIa) R = H (ацикловир);  
(IIб) R = H<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sub>3</sub>



(IIIa) R = H; (IIIб) R = F

Ранее на примере фосфитов и фторфосфатов других нуклеозидов было показано, что они значительно стабильнее к дефосфорилированию фосфатазами и другими ферментами плазмы крови человека [6, 7], чем нуклеотиды с немодифицированной фосфатной группой.

Согласно данным табл. 1, соединения (IIIa) и (IIIб) подавляют продукцию ВПГ-1 в клетках Vero. Это означает, что предпринятый нами путь модификации молекулы ацикловира позволяет сохранить достаточно высокую антигерпетическую активность, которая носит выраженный селективный характер, на что указывают величины индексов селективности этих соединений,

Сокращения: ВПГ-1/L<sub>2</sub> – вирус герпеса простого, тип 1; ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R – вирус герпеса простого, тип 1, резистентный к ацикловиру; ЦТД – цитопатогенное действие вируса; ИД<sub>50</sub> и ИД<sub>95</sub> – дозы, ингибирующие вирусное цитопатогенное действие на 50 и 95%; ЦТД<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая доза для незараженных клеток Vero; ИС – индекс селективности (отношение ЦТД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>); БОЕ – бляшкообразующие единицы.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

**Таблица 1.** Действие модифицированных аналогов ацикловиримонофосфата на репродукцию ВПГ-1 в культуре клеток Vero

| Соединение      | Цитотоксичность – ЦТД <sub>50</sub> , мкМ | ВПГ-1/L <sub>2</sub>   |                        |     | ВПГ-1/L <sub>2</sub> /R |                        |     |
|-----------------|---|------------------------|------------------------|-----|-------------------------|------------------------|-----|
|                 |   | ИД <sub>50</sub> , мкМ | ИД <sub>95</sub> , мкМ | ИС  | ИД <sub>50</sub> , мкМ  | ИД <sub>95</sub> , мкМ | ИС  |
| (IIIa)          | 3922                                      | 13.7                   | 85.0                   | 286 | 24.5                    | 85.0                   | 160 |
| (IIIб)          | 741                                       | 4.9                    | 18.5                   | 151 | 370.4                   | –*                     | 2   |
| Ацикловир (IIa) | 533                                       | 1.9                    | 11.1                   | 281 | 400                     | –*                     | 1   |

\* Величина ИД<sub>95</sub> для ацикловира и фторфосфата (IIIб) не достигалась.

**Таблица 2.** Влияние ацикловира и его фосфорных эфиров на выживаемость (%) культуры клеток Vero, инфицированных ВПГ-1\*

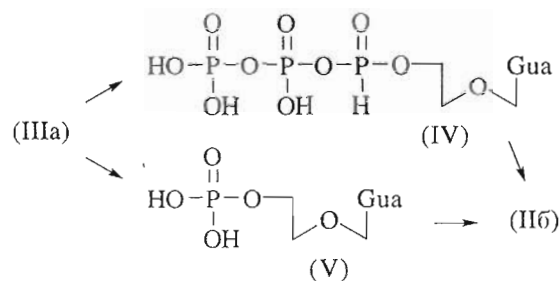
| Незараженная культура клеток | Зараженная культура клеток в отсутствие соединений | Зараженная культура клеток в присутствии |                        |                        |
|------------------------------|--|--|------------------------|------------------------|
|                              |  | (IIIa)                                   | (IIIб)                 | ацикловира             |
| 88                           | 11   | 80; 83** (81.7)<br>46; 50** (40.8)       | 79 (38.6)<br>49 (19.3) | 88 (27.8)<br>64 (13.9) |

\* Культура клеток Vero инфицировалась ВПГ-1/L<sub>2</sub> через 36 ч роста; учет результатов через 48 ч после инфицирования клеток. В скобках указаны концентрации соединений (мкМ).

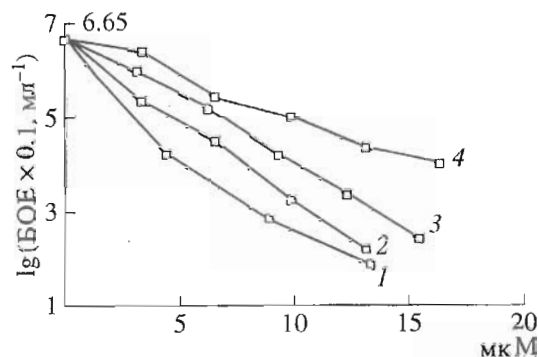
\*\* Штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R.

сравнимые с наблюдаемыми для ацикловира. Хотя активность соединений (IIIa, IIIб) на чувствительном к ацикловиру штамме ВПГ-1/L<sub>2</sub> по величине ИД<sub>50</sub> в 3–6 раз ниже, чем у ацикловира, их токсичность по сравнению с ацикловиром значительно понижена. Более интересными представляются нам результаты, полученные на резистентном к ацикловиру штамме ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R. Для соединения (IIIa) в отношении этого штамма наблюдалось лишь двукратное снижение активности, тогда как для ацикловира – в 200 раз. Соединение (IIIб) оказалось мало активным в отношении ацикловир-резистентного штамма. Эти данные могут быть объяснены особенностью молекулярного механизма действия фосфита (IIIa). Очевидно, что гидролиз фосфоэфирной связи соединения (IIIa) с образованием ацикловира в клетках не объясняет полученные данные, так как в этом случае активность соединения (IIIa) не должна превышать активность ацикловира. Можно полагать, что фосфит (IIIa) либо непосредственно превращается в β,γ-дифосфат (IV) (схема), либо в процессе диффузии в клетку окисляется в ацикловиримонофосфат (V) с последующим фосфорилированием клеточными ферментами с образованием трифосфата (IIб). Нам представляется более вероятной схема ингибирования репликации вируса с участием фосфитдифосфата (IV), так как в случае образования монофосфата (V) низкая токсичность фосфита (IIIa) необъяснима. Мы полагаем, что в основе антигерпетического дей-

ствия соединения (IIIa) может лежать механизм, аналогичный действию ацикловира.



Из рисунка видно, что все исследованные соединения эффективно снижают инфекционный титр вируса в диапазоне нецитотоксических концентраций. Однако по этому показателю ацикло-



Влияние ацикловира (I) и его фосфорных эфиров (IIIб) (2) и (IIIa) (3, 4) на инфекционный титр ВПГ-1/L<sub>2</sub> (1–3) и ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R (4).

вир, как имеющий минимальную величину ИД<sub>50</sub>, проявляет наибольшую активность. Таким образом, антивирусный эффект изучаемых соединений может быть представлен в виде ряда ацикловир > > (IIIб) > (IIIа). Тем не менее величины снижения инфекционных титров у всех трех соединений достаточно близки.

Благодаря противовирусному действию соединения (IIIа, IIIб) обладают "терапевтическим" эффектом в отношении культуры клеток Vero, инфицированных вирусом (табл. 1, 2). Все три соединения подавляют репродукцию ВПГ-1 и, таким образом, значительно увеличивают количество живых клеток по сравнению с инфицированными культурами клеток, не обработанными анализируемыми соединениями, когда количество живых клеток составляло ~11%.

Полученные результаты показывают, что предлагаемый нами путь модификации монофосфата ацикловира для создания ингибиторов репродукции вируса герпеса достаточно перспективен.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединение (IIIа) ранее было синтезировано А.А. Хорлиным и соавт. [8], и были получены предварительные результаты о его антигерпетическом действии.

Использовали DEAE-целлюлозу (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма) DE-32 (Whatman); 2,4,6-триизопрропилбензолсульфонилхлорид (TPS-Cl); силикагель LiChroprep RP-18 (25–40 мкм; Merck); треххлористый фосфор (Fluka); триэтилфосфат, пиридин и DMF (Aldrich).

ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker WP-200 SY (США) с рабочей частотой 200.13 МГц (внутренний стандарт – трет-бутиловый спирт) для <sup>1</sup>H-ЯМР и 81 МГц (с подавлением спин-спинового фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) для <sup>31</sup>P-ЯМР, в качестве растворителя использовали D<sub>2</sub>O. Масс-спектры в режиме FAB (бомбардировка ускоренными атомами) регистрировали на спектрометре Kratos MS-50TC в глицериновой матрице.

**Фосфит ацикловира (IIIа), аммониевая соль.** К охлажденной до 0°C суспензии 90 мг (0,4 ммоль) ацикловира (IIа) в триэтилфосфате (1 мл) прибавляли 174 мкл (2 ммоль) РСl<sub>3</sub>, выдерживали 6 ч при 5°C и 2 ч при 20°C. Реакционную массу нейтрализовали прибавлением 0,5 М ТЕАВ (12 мл), упаривали, разбавляли водой до 100 мл и наносили на колонку (10 × 2,5 см) с DE-32, промывали колонку водой (200 мл) и элюировали в линейном градиенте концентрации NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> (0 → 0,15 М, V 1,5 л). УФ-поглощающие фракции (при λ 254 нм) концентрировали, упаривали с водой в вакууме и оста-

ток дополнительно очищали на колонке (2 × 20 см) с LiChroprep RP-18 с элюцией водой. Фракции, содержащие фосфит (IIIа), лиофильно высушивали. Выход 78 мг (64%). <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м. д., J, Гц): 7,91с (1H, H-8), 6,56д (1H, J<sub>HP</sub> 640 Гц, H-P), 5,42с (2H, CH<sub>2</sub>Gua), 3,85м (2H, CH<sub>2</sub>OP), 3,67м (2H, CH<sub>2</sub>OC). <sup>31</sup>P-ЯМР (δ, м. д.): 7,2с. Масс-спектр, m/z: 290 (MН<sup>+</sup>).

**Фторфосфат ацикловира (IIIб), аммониевая соль.** К раствору 50 мг (0,22 ммоль) ацикловира (IIа) в смеси 1 мл пиридина и 1 мл DMF прибавляли раствор 67 мг (0,67 ммоль) фторфосфорной кислоты в 1 мл DMF и 133 мг (0,44 ммоль) 2,4,6-триизопрропилбензолсульфонилхлорида, перемешивали 18 ч при 20°C. Разбавляли реакционную массу 50 мл воды и наносили на колонку с DE-32, далее поступали как в случае (IIIа). Выход 36 мг (52%). <sup>1</sup>H-ЯМР: 7,87с (1H, H-8), 5,48с (2H, CH<sub>2</sub>Gua), 4,12м (2H, CH<sub>2</sub>OP), 3,83м (2H, CH<sub>2</sub>OC). <sup>31</sup>P-ЯМР: –4,90д, J<sub>P,F</sub> 933 Гц. Масс-спектр, m/z: 308 (MН<sup>+</sup>).

**Эксперименты в клеточных системах.** Использовали культуру клеток Vero (клетки почек африканских зеленых марьшшек), полученных из лаборатории культуры тканей Института вирусологии РАН. Клетки поддерживали в среде Игла MEM, содержащей 5% эмбриональную сыворотку телят (Fluka, Швейцария).

Использовали штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>, полученный из музея вирусов Института вирусологии РАН. Клетки Vero инфицировали ВПГ-1/L<sub>2</sub> в присутствии среды Игла MEM, содержащей 5% эмбриональной сыворотки телят. Для культивирования клеток и их последующего инфицирования использовали 96-луночные пластиковые панели (Linbro, Flow Lab., Великобритания). Каждая лунка содержала в среднем 1,4 × 10<sup>5</sup> клеток (кл), объем среды 185 мкл. Множественность инфицирования – 0,01 БОЕ/кл. Развитие вирусной инфекции оценивали по выраженности вирусиндуцированного ЦПД, которое обычно достигало максимума через 48 ч, т.е. охватывало клеточный монослой полностью. В соответствии с общепринятой оценкой такая выраженность вирусиндуцированного ЦПД принималась за 100%.

Антивирусное действие оценивали методом [9] по способности изучаемых соединений ингибировать развитие вирусиндуцированного ЦПД на 50% по сравнению с полным ЦПД в контрольных инфицированных культурах, а также по способности соединений практически полностью предотвращать развитие вирусиндуцированного ЦПД.

Мутантный штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>, резистентный к ацикловиру, получали путем серийных пассажей в присутствии возрастающих (22,2–44,4 мкМ) концентраций ацикловира. Всего было сделано семь пассажей, и величина ИД<sub>50</sub> увеличилась с 1,9 до 400 мкМ. Вирусный штамм, полученный таким образом, пассировался еще троекратно в присут-

ствии 44.4 мкМ ацикловира и использовался для получения вирусного клона, резистентного к ацикловиру. Мы использовали по этой позиции основополагающие методические рекомендации, содержащиеся в работе [10].

Для определения инфекционного титра использовали культуру после 48 ч инфекции. Культуральную жидкость и клетки, разрушенные с помощью ультразвука, подвергали 10-кратному разведению и применяли для инфицирования клеток Vero. Ацикловир в концентрации 8.9 мкМ не снижал инфекционный титр ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, который был равен 6.8 lg (БОЕ × 0.1, мл<sup>-1</sup>).

Для количественного определения выживаемости клеток при исследовании цитотоксичности и терапевтического действия аналогов нуклеозидов использовали способность мертвых клеток окрашиваться трипановым синим [11]. За величину ЦТД<sub>50</sub> принимали ту концентрацию соединения, которая обеспечивала 50% выживаемость клеток через 72 ч контакта с изучаемыми соединениями.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 96-04-11898а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E., Holy A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzari ni J., Maudgal P.C.* // *Nature*. 1986. V. 323. P. 464–467.

2. *De Clercq E.* // *Biochem. Pharmacol.* 1991. V. 42. P. 963–972.
3. *Votruba I., Bernaerts R., Sakuma T., De Clercq E., Merita A., Rosenberg I., Holy A.* // *Mol. Pharmacol.* 1987. V. 32. P. 524–528.
4. *Eliot G.B.* // *Antiviral Chemotherapy. New Directions for Clinical Application and Research* / Eds J. Milles, L. Corey. Elsevier, 1986. P. 118–137.
5. *Vere Hodge R.A., Cheng Y.-C.* // *Antivir. Chem. Chemother.* 1993. V. 4. Suppl. 1. P. 13–24.
6. *Куханова М.К., Тарусова Н.Б., Ясько М.В., Арзуманов А.А., Гудима С.О., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш.* // *Молекуляр. биология*. 1992. Т. 26. С. 1148–1159.
7. *Кузнецова Е.В., Куханова М.К., Арзуманов А.А., Краевский А.А.* // *Молекуляр. биология*. 1995. Т. 29. С. 415–420.
8. *Хорлин А.А., Готтих Б.П., Флорентьев В.Л., Кочеткова С.В., Галегов Г.А., Шобухов В.М., Веселовская Т.Н.* 9-(4-Гидрофосфорил-2-оксабутил)гуанин, обладающий избирательной активностью против вируса герпеса: А. с. 1594953 СССР, 1990.
9. *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.
10. *Field H.J., Darby G., Wildy P.* // *J. Gen. Virol.* 1980. V. 49. Part 1. P. 115–124.
11. *Holy A., De Clercq E., Votruba I.* // *Phosphorylmethyl Ethers of Nucleosides and their Acyclic Analogues* / Ed. J.C. Martin. Washington, 1989. P. 50–71.

## Synthesis and Antiherpetic Activity of Acyclovir Phosphoesters

G. A. Galegov\*, V. M. Shobukhov\*, N. A. Leont'eva\*, and M. V. Yas'ko\*\*

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

\*\* *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**Abstract**—9-(Hydroxyethylloxymethyl)guanine (acyclovir) phosphite and fluorophosphate were synthesized by the reactions of acyclovir with phosphorus trichloride in triethyl phosphate and with fluorophosphoric acid in the presence of 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, respectively, and characterized by the data of <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR and mass spectra. These products selectively inhibit reproduction of the herpes simplex virus type 1 in the Vero cell culture, the phosphite being also substantially active against a herpes virus strain resistant to acyclovir.

*Key words: nucleotide acyclic analogues, herpes simplex virus, acyclovir*