



УДК 577.113.3

СИНТЕЗ И АНТИГЕРПЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ Z- И E-ИЗОМЕРОВ 9-(3-ФОСФОНОМЕТОКСИПРОП-1-ЕН-1-ИЛ)АДЕНИНА

© 2005 г. А. В. Иванов^{*,#}, В. Л. Андропова^{**},
Г. А. Галегов^{**}, М. В. Ясько^{*}

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

^{**}Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

Поступила в редакцию 08.12.2003 г. Принята к печати 05.08.2004 г.

Осуществлен синтез Z- и E-изомеров 9-(3-фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина. Исследована стереоселективность образования двойной связи путем варьирования сульфонильных групп. Полученные фосфонаты проявили умеренную противовирусную активность в культурах клеток Vero, инфицированных вирусом простого герпеса типа 1. Показано, что Z-изомер является более эффективным ингибитором репродукции вируса как для эталонного штамма, так и для резистентного к ацикловиру.

Ключевые слова: нуклеотиды, фосфонаты, вирус простого герпеса.

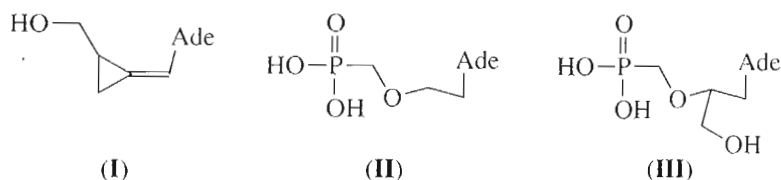
ВВЕДЕНИЕ

Ациклические аналоги нуклеозидов и нуклеотидов являются относительно новой группой антивирусных агентов. Для них характерны как разнообразие структур, так и широкий спектр противовирусной активности. Так, синаденол (**I**) и родственные ему соединения ингибируют репродукцию герпесвирусов, а также вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита В [1–3]. К другой группе аналогов относятся соединения, содержащие фосфонометоксильный фрагмент, например 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденин (РМЕА, **II**) и (S)-9-(3-гидрокси-2-фосфонометоксипропил)аденин (**III**), которые подавляют репликацию как ВИЧ, так и вируса простого герпеса [4]. Более того, среди ациклических аналогов имеется ряд соединений, уже используемых в медицинской практике как лекарственные препараты, например ацикловир (Zovirax[®]), фамцикловир (Famvir[®]), пенцикловир (Denavir[®]) и т. д. [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

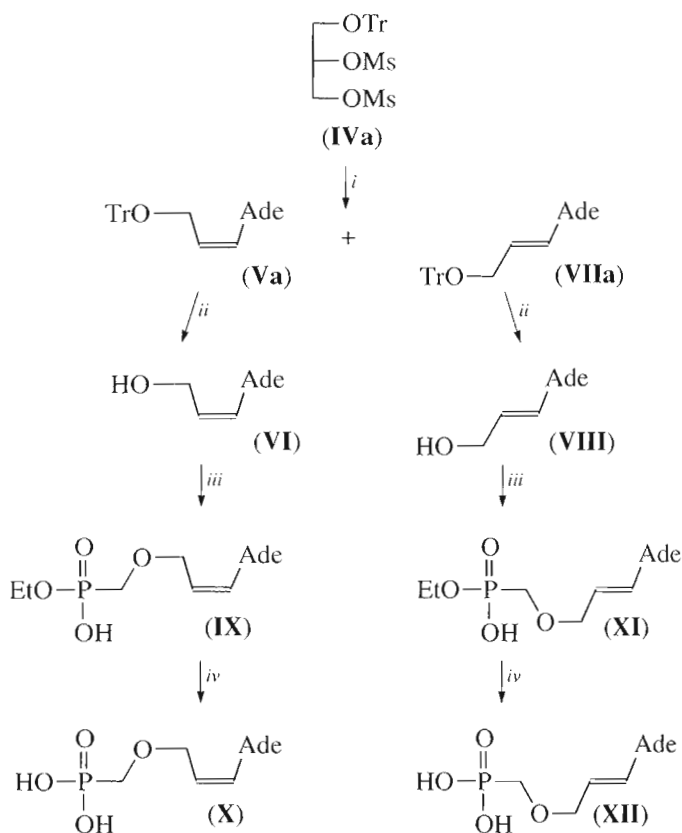
В данной работе описан синтез двух новых ациклических аналогов нуклеотидов, содержащих сопряженную с нуклеиновым основанием двойную связь (подобно синаденолу (**I**)) и фосфонометоксильный фрагмент (подобно РМЕА (**II**)), а именно, *цис*- и *транс*-изомеров 9-(3-фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**X**) и (**XII**) (схема 1), а также исследование их противогерпетической активности.

Синтез соединений (**X**) и (**XII**) заключался в получении алкилирующего агента на основе глицерина (**IVa**), который конденсировали с натриевой солью аденина. Полученную смесь алкенов (**Va**) и (**VIa**) разделяли, и индивидуальные изомеры обрабатывали уксусной кислотой для удаления тритильных групп. После фосфонометилирования спиртов (**VI**) и (**VIII**) и последующего деблокирования выделяли целевые *цис*- и *транс*-фосфонаты (**X**) и (**XII**).



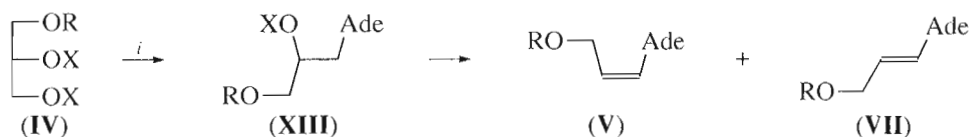
Сокращения: HSV-1/L₂ – вирус простого герпеса, тип 1, штамм L₂; HSV-1/L₂/R – вирус простого герпеса, тип 1, штамм L₂, резистентный к ацикловиру; ИД₅₀ и ИД₉₅ – дозы, ингибирующие вирусное цитопатогенное действие на 50 и 95%; ЦТД₅₀ – тканевая цитотоксическая доза, вызывающая изменение 50% клеточного монослоя; ИС – индекс селективности (отношение ЦТД₅₀ к ИД₅₀); Tr – тритил, трифенилметил; Ts – тозил, *n*-толуолсульфонил; Ms – мезил, метансульфонил; TBDMMS – *tert*-бутилдиметилсилил-радикал; IMP – моноэтиловый эфир йодметилфосфоновой кислоты.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: aivanov@yandex.ru).



i) AdeH, NaH/DMF; *ii)* CH₃COOH; *iii)* IMP, NaH/DMF; *iv)* Me₃SiBr/DMF.

Схема 1.



(IVa): R = Tr, X = Ms **(XIIIa):** R = Tr, X = Ms
(IVb): R = Tr, X = Ts **(XIIIb):** R = Tr, X = Ts **(Va):** R = Tr **(VIIa):** R = Tr
(IVc): R = TBDMS, X = Ts **(XIIIc):** R = TBDMS, X = Ts **(Vb):** R = TBDMS **(VIIb):** R = TBDMS

i) AdeH, NaH или (Me₃Si)₂NK/DMF

Схема 2.

В литературе описано несколько методов получения алкенов, двойная связь которых сопряжена с ароматической системой гетероцикла. Один из путей синтеза заключается в получении соединения, содержащего несопряженную двойную связь, и его последующей изомеризации путем нагревания в присутствии основания. Например, *Z*- и *E*-изомеры 9-(4-гидроксипут-1-ен-1-ил)аденина были получены нагреванием соответствующих бут-2-ен-1-ильных производных в присутствии *tert*-бутилата калия [6]. Следует отметить, что данный метод не применим для получения пропеновых производных. Другая стратегия состоит в алкилировании

нуклеинового основания синтонами, содержащими vicinalные атомы брома, и последующем элиминировании HBr [1]. Сходный подход мы выбрали для получения целевых *R*-оксипропениладенинов (**V**) и (**VII**) (схема 2). Алкилирующие агенты (**IVa**)–(**IVc**) были синтезированы из глицерина защитой одного из первичных гидроксильных групп тритильной или *tert*-бутилдиметилсилильной группами и последующим введением двух сульфонильных групп. Полученные синтоны (**IVa**)–(**IVc**) использовались для алкилирования аденина в присутствии основания, в качестве которого выступали гидрид натрия или бис(триметилсилил)амид калия.

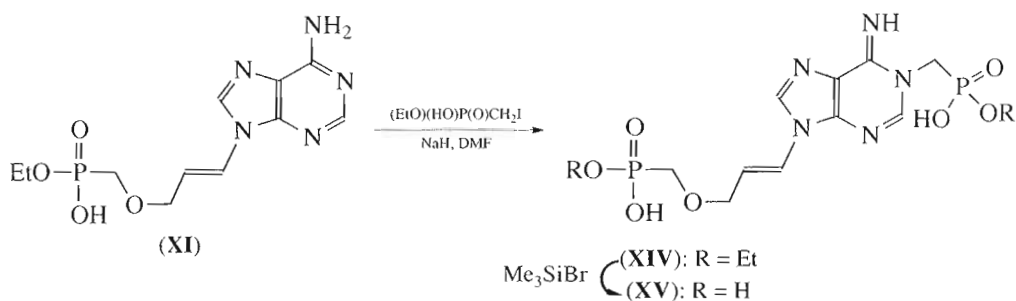


Схема 3.

Реакция синтона (**IVa**) с аденином в присутствии гидрида натрия приводила к смеси *цис*- и *транс*-изомеров 9-(3-тритилоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**Va**) и (**VIIa**). Следует отметить, что при проведении реакции в условиях недостатка гидрида натрия основным продуктом реакции являлся 9-(2-метилокси-3-тритилоксипропил)аденин (**XIIIa**). При избытке гидрида натрия интермедиат (**XIIIa**) не был обнаружен. По-видимому, в данных условиях скоростным лимитирующей стадией является не элиминирование 2'-метильной группы, а алкилирование нуклеинового основания.

Разделение *цис*- и *транс*-изомеров тритильных производных (**Va**) и (**VIIa**) было осуществлено кристаллизацией из хлороформа. *транс*-Алкен (**VIIa**) значительно хуже растворим в CHCl_3 и может быть получен в чистом виде уже однократной кристаллизацией. Для более полного отделения *цис*-изомера (**Va**) маточкики упаривали, и остаток вновь кристаллизовали из CHCl_3 . Таким образом, в конечном фильтрате содержание *цис*-изомера (**Va**) составило ~90%. После удаления защитной группы обработкой 80% уксусной кислотой очистку *цис*-изомера (**VI**) осуществляли хроматографией на силикагеле.

Конфигурацию двойной связи определяли с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Для *цис*-алкенов (**Va**) и (**VI**) $\text{KCCB } ^3J_{1,2}$ составила ~8.5 Гц, а для *транс*-изомеров (**VIIa**) и (**VIII**) – более 14 Гц.

Соотношение *Z*- и *E*-изомеров (**Va**) и (**VIIa**) в реакционной смеси при использовании димезилтретилглицерина (**IVa**) составило 1 : 3.5. С целью изменения данного соотношения мы заменили димезилтретилглицерин (**IVa**) на дитозилтретилглицерин (**IVb**) или на дитозилсилильное производное (**IVc**). Однако при переходе от метильных групп к более гидрофобным и объемным тозилным соотношение изомеров (**Va**) и (**VIIa**) осталось неизменным, хотя оказалось возможным достижение сходного выхода при уменьшении времени реакции с 8 до 6 ч. Соотношение *цис*- и *транс*-изомеров не изменилось и при замене тритильной защитной группы на *трет*-бутилдиметилсилильную. Использование гексаметилдисилиламида калия вместо NaNH_2 также не привело к изменению соотношения *цис*- и *транс*-изомеров.

Традиционный метод введения в молекулу вещества фосфометильного фрагмента заключается в реакции соответствующего спирта с моно- или диалкиловыми эфирами йод-, тозилокси- или трифторметилсульфонилхлоридфосфононовой кислот в присутствии гидрида натрия [7–12]. В данной работе мы использовали моноэтиловые эфиры йодметилфосфононовой и тозилхлоридфосфононовой кислот, являющиеся доступными и стабильными соединениями. Кроме того, их использование позволяет выделять продукты реакции ионообменной или обращенно-фазовой хроматографией.

Реакцию алкилирования спиртов (**VI**) и (**VIII**) моноэтиловым эфиром йодметилфосфононовой кислоты (**IMP**) в присутствии NaNH_2 проводили в DMF (схема 1). Продукты разделяли обращенно-фазовой хроматографией, элюируя аммоний-бикарбонатным буфером, что позволило получить целевые фосфонаты в виде аммониевых солей. Структуру соединений подтверждали методами УФ- и ЯМР-спектроскопии. Максимумы поглощения в УФ-спектрах продуктов (**IX**) и (**XI**) не отличаются от максимумов поглощения в спектрах исходных соединений (**VI**) и (**VIII**), что свидетельствует об отсутствии модификации нуклеинового основания.

В ^1H -ЯМР-спектрах фосфонатов (**IX**) и (**XI**) наблюдался дублет при ~3.8 м. д., соответствующий метиленовой группе при атоме фосфора. Кроме того, ^{31}P -ЯМР-спектры фосфонатов (**IX**) и (**XI**) содержат один сигнал с хим. сдвигом около 15–18 м. д., характерный для алкилхлоридфосфононовых кислот [10]. В случае *транс*-изомера, кроме целевого фосфоната (**XI**), был выделен побочный продукт (**XIV**) (схема 3). ^1H -ЯМР-спектр этого соединения содержал сигналы двух этильных групп, при этом в ^{31}P -ЯМР-спектре наблюдался лишь один уширенный синглет. После обработки соединения триметилбромсиланом для удаления этильных групп ^{31}P -ЯМР-спектр продукта (**XV**) содержал два сигнала при 16.2 и 16.4 м. д. При этом в ^1H -ЯМР-спектре четко разрешились сигналы двух метиленовых групп при атомах фосфора. Следует отметить, что $\text{KCCB } ^2J_{\text{CH}_2, \text{P}}$ в случае фосфометильной группы при атоме кислорода составляет 8.7 Гц, тогда как константа другого

Противогерпетическая активность (*Z*)- и (*E*)-9-(3-фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина

Соединение	ЦТД ₅₀ , мМ	HSV-1/L ₂			HSV-1/ACV ^R		
		ИД ₅₀ , мМ	ИД ₉₅ , мМ	ИС	ИД ₅₀ , мМ	ИД ₉₅ , мМ	ИС
(X)	>3.5	0.095	1.53	>34	0.11	0.86	>34
(XII)	>3.5	0.39	1.57	>8	0.44	1.57	>8
Ацикловир	>2.2	0.0017	0.0036	>1300	0.53	0.89	>2.5
(II)*	>0.36	0.08		>4.5	0.08		>4.5

* Данные приведены из работы [12]. Авторы использовали HSV-1 штамм BWS в культуре клеток Vero. Множественность инфицирования аналогична описанному в "Эксперимент. части".

сигнала достигала 11 Гц, что характерно для фосфометильной группы при атоме азота гетероциклического основания [13]. Кроме того, при переходе от *N*¹-незамещенных фосфонатов (XI) и (XII) к *N*¹-замещенным (XIV) и (XV) в УФ-спектре наблюдается сдвиг максимума поглощения на 7 нм в длинноволновую область.

Совокупность этих данных позволила нам приписать полученному соединению структуру (*E*)-1-(фосфометил)-9-(3-фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (XV). Приведенные данные коррелируют с описанными в литературе для сходного соединения в ряду карбоциклических аналогов нуклеозидов [9].

При 2–3-кратном избытке алкилирующего реагента IMP побочный диэфир (XIV) становился основным продуктом реакции, тогда как при использовании 1.5 экв. йодметилфосфоната в расчете на спирт (VIII) выход целевого монофосфоната (XI) достигал 38%, а доля диэфира (XIV) не превышала 15%. По литературным данным, защита экзоциклической аминогруппы нуклеинового основания позволяет избежать его модификации, в том числе и *N*¹-алкилирования [14]. Однако в нашем случае защита аденинового основания соединения (VIII) с использованием диэтилацетата диметилформамида с целью последующего введения полученного соединения (XVI) в реакцию с IMP не влияла на соотношение продуктов моно- и бисалкилирования. Замена IMP на тозилосиметилфосфонат также не привела к снижению количества побочного продукта (XIV).

Превращение моноэфиров (IX) и (XI) в соответствующие кислоты (X) и (XII) проводили обработкой триметилбромсиланом в DMF. Продукты реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией.

Таким образом, нами были получены целевые *Z*- и *E*-изомеры 9-(3-фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина.

Антивирусные свойства полученных фосфонатов (X) и (XII) были исследованы в культуре клеток Vero, инфицированных HSV типа 1 (HSV-1). Оба соединения показали умеренную противогерпетическую активность как на эталонном штамме, так и на резистентном к ацикловиру (таблица). *цис*-Изомер (X) в 4 раза более эффективно подавлял репродукцию вируса герпеса, чем *транс*-изо-

мер (XII). При этом активность была сравнима с активностью 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденина (II). Полученные фосфонаты (X) и (XII) оказались менее токсичны, чем фосфонат (II), и соответственно превосходили его по индексу селективности.

Сохранение противогерпетической активности соединений (X) и (XII) на резистентном штамме вируса может быть связано с тем, что резистентность к ацикловиру в 95% случаев связана с мутацией вирусной тимидинкиназы, в результате которой фермент не фосфорилирует модифицированные нуклеозиды [15]. Однако соединения (X) и (XII) не требуют первого акта кинирования для превращения в соответствующие аналоги dNMP, и, таким образом, сохраняют активность против штамма, резистентного к ацикловиру.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аденин (Reanal, Венгрия), метансульфонилхлорид, *n*-толуолсульфонилхлорид, трифенилхлорметан, триметилбромсилан, глицерин, 80% суспензию NaN в минеральном масле, *трет*-бутилдиметилхлорсилан, бис(триметилсилил)амид калия (Aldrich, США). Этиловые эфиры йодметилфосфоновой и тозилосиметилфосфоновой кислот были синтезированы как описано в работах [11, 16].

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (63–100 мкм), LiChroprep RP-8 (40–63 мкм) и LiChroprep RP-18 (25–40 мкм) (Merck, Германия).

Спектры ЯМР регистрировали в шкале δ на спектрометре AMX III-400 (Bruker, США) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (внутренний стандарт – Me₄Si для CDCl₃ и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D₂O), 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия), внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) и 100 МГц для ¹³C-ЯМР. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-2401 P (Shimadzu, Япония).

3-Трилоксипропан-1,2-диол синтезирован как описано в работе [17]. Выход 81%. Т. пл. 90–92°C (лит. 92–94°C). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.46 (6 H, д, ³J_{o,m} 7.2, *o*-CH, Tr), 7.32 (6 H, т, ³J_{m,n} 7.8, *m*-CH, Tr), 7.3 (3 H, т, *n*-CH, Tr), 3.87 (1 H, м, H₂), 3.67 (1 H, дд,

$^2J_{1a,16}$ 11.2, $^3J_{1a,2}$ 3.4, H_{1a}), 3.58 (1 H, дд, $^3J_{16,2}$ 6.2, H_{1b}), 3.23 (2 H, м, H_3).

1,2-Бис(мезилокси)-3-третилоксипропан (IVa). К раствору 3-третилоксипропан-1,2-диола (3.00 г, 8.97 ммоль) в пиридине (50 мл) при 0°C прибавляли метансульфонилхлорид (1.70 мл, 22.4 ммоль), перемешивали 1 ч при +4°C и оставляли при комнатной температуре. Через 20 ч реакционную смесь упаривали в вакууме, к остатку прибавляли CCl_4 (50 мл), полученный раствор промывали водным $NaHCO_3$ (50 мл), водой (2 × 50 мл), высушивали Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток кристаллизовали из CCl_4 , высушивали на воздухе и получали 3.24 г (74%) продукта (IVa). Т. пл. 107–110°C (разл.). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.41 (6 H, д, $^3J_{o,m}$ 7.8, *o*-CH), 7.32 (6 H, дд, $^3J_{m,p}$ 7.2, *m*-CH), 7.26 (3 H, т, *n*-CH), 4.85 (1 H, м, $^3J_{2,3a}$ 4.7, $^3J_{2,3b}$ 5.3, H_2), 4.40 (2 H, м, H_1), 3.47 (1 H, дд, $^2J_{3a,3b}$ 10.6, H_{3a}), 3.40 (1 H, дд, H_{3b}), 3.04 + 3.01 (6 H, с + с, 2 × CH_3).

1,2-Бис(тозилокси)-3-третилоксипропан (IVb). Раствор 3-третилоксипропан-1,2-диола (3.00 г, 8.97 ммоль) и *n*-толуолсульфонилхлорида (5.13 г, 26.9 ммоль) в пиридине (50 мл) выдерживали при комнатной температуре в течение 20 ч и реакционную смесь упаривали в вакууме. Остаток растворяли в CCl_4 (70 мл), последовательно промывали органический слой водной лимонной кислотой (30 мл), водой (2 × 30 мл), водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл), водой (2 × 30 мл) и высушивали над Na_2SO_4 . Маслообразный остаток после упаривания кристаллизовали из CCl_4 (25 мл) и высушивали на воздухе. Получили 4.16 г (72%) продукта (IVb). Т. пл. 104–106°C (разл.). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.68 + 7.64 (4 H, д + д, $^3J_{o,m}$ 8.4, *o*-CH, Ts), 7.29–7.23 (19 H, м, Tt + *m*-CH, Ts), 4.55 (1 H, м, H_2), 4.14 (2 H, м, H_1), 3.26 (2 H, м, H_3), 2.43 + 2.42 (6 H, с + с, 2 × CH_3 , Ts).

1,2-Бис(тозилокси)-3-(трет-бутилдиметилсилилокси)пропан (IVc). Раствор трет-бутилдиметилхлорсилана (1.62 г, 10.8 ммоль) и глицерина (12.5 мл, 200 ммоль) в пиридине (80 мл) выдерживали при комнатной температуре 18 ч, затем реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток упаривали с толуолом (2 × 15 мл), растворяли в хлороформе (50 мл), раствор промывали водным раствором $NaHCO_3$ (40 мл), водой (2 × 40 мл) и высушивали Na_2SO_4 . Маслообразный остаток растворяли в пиридине (70 мл), прибавляли *n*-толуолсульфонилхлорид (5.13 г, 26.9 ммоль) и выдерживали 18 ч при комнатной температуре, затем реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (50 мл). Раствор промывали водным раствором $NaHCO_3$ (30 мл), водой (2 × 30 мл) и высушивали Na_2SO_4 . Растворители упаривали в вакууме и получали 2.82 г (51%) маслообразного продукта (IVc). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.71 (4 H, д, $^3J_{o,m}$ 8.4, *o*-CH), 7.28 (4 H, д, *m*-CH), 4.57 (1 H, м, H_2), 4.17 (2 H, м, H_1), 3.30 (2 H, м, H_3),

2.45 + 2.43 (6 H, с + с, 2 × CH_3 , Ts), 0.90 (9 H, с, Me_3Si), 0.11 (6 H, с, Me_2Si).

(Z)- и (E)-9-(3-Третилоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (Va) и (VIIa). Метод А. Суспензию аденина (827 мг, 6.12 ммоль) и $NaNH$ (230 мг, 7.67 ммоль) в DMF (30 мл) перемешивали до окончания выделения водорода и выдерживали еще 1 ч при 60°C, затем прибавляли раствор 1,2-бис(мезилокси)-3-третилоксипропана (IVa) (1.50 г, 3.06 ммоль) в смеси DMF (15 мл) и ацетонитрила (5 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником 8 ч, после чего охлаждали, упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (40 мл), раствор промывали водой (2 × 50 мл), высушивали Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (4 мл) и хроматографировали на силикагеле (колонка 3.8 × 10 см), элюируя сначала хлороформом (200 мл), а затем 2% раствором EtOH в хлороформе (400 мл). Фракции, содержащие смесь *цис*- и *транс*-алкенов (Va) и (VIIa), упаривали в вакууме и получали 710 мг (54%) смеси *Z*- и *E*-изомеров в соотношении 1 : 3.5 (по данным 1H -ЯМР). Кристаллизация из хлороформа приводила к чистому *E*-изомеру (VIIa), дополнительное количество которого было получено концентрированием фильтратов и повторной кристаллизацией. Суммарный выход чистого *E*-изомера (VIIa) после высушивания на воздухе составил 451 мг (34%). Фильтрат после двух кристаллизаций *E*-изомера упаривали в вакууме и получили 93 мг (7%) маслообразного *Z*-изомера (Va) (чистота >90%).

(Z)-9-(3-Третилоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (Va): УФ (CH_3OH): λ_{max} 261 нм. 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 8.33 (1 H, с, H_8), 7.89 (1 H, с, H_2), 7.42 (6 H, д, $^3J_{o,m}$ 8.4, *o*-CH), 7.32–7.13 (9 H, м, *m*-CH + *n*-CH), 6.96 (1 H, д, $^3J_{1',2'}$ 9.0, $H_{1'}$), 5.60 (2 H, уш.с, 6- NH_2), 5.88 (1 H, дт, $^3J_{2',3'}$ 6.9, $H_{2'}$), 3.78 (2 H, дд, $^4J_{1',3'}$ 0.9, $H_{3'}$).

(E)-9-(3-Третилоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (VIIa): УФ (CH_3OH): λ_{max} 261 нм. Т. пл. 192–195°C. 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 8.39 (1 H, с, H_8), 7.96 (1 H, с, H_2), 7.49 (6 H, д, $^3J_{o,m}$ 7.5, *o*-CH), 7.33 (6 H, т, $^3J_{m,p}$ 7.5, *m*-CH), 7.25 (4 H, м, *n*-CH + $H_{1'}$), 6.53 (1 H, дт, $^3J_{1',2'}$ 14.3, $^3J_{2',3'}$ 5.6, $H_{2'}$), 5.56 (2 H, уш. с, 6- NH_2), 3.86 (2 H, дд, $^4J_{1',3'}$ 1.6, $H_{3'}$).

Методы Б и В. Суспензию аденина (1.5 г, 11 ммоль) и $NaNH$ (467 мг, 15.6 ммоль) в DMF (50 мл) перемешивали до окончания выделения водорода и нагревали еще 1 ч при 60°C, затем прибавляли раствор 1,2-бис(тозилокси)-3-третилоксипропана (IVb) (5.7 г, 5.6 ммоль) (метод Б) или 1,2-бис(тозилокси)-3-(трет-бутилдиметилсилилокси)пропана (IVc) (2.8 г, 5.5 ммоль) (метод В) в смеси DMF (25 мл) и ацетонитрила (10 мл). Смесь кипятили с обратным холодильником 6 ч, охлаждали и обрабатывали аналогично методу А. Выход смеси целевых (Va) и (VIIa) по методу Б составил 1.64 г (68%), а маслообразной смеси (Vb) и (VIIb) по методу В – 0.98 г

(58%). Соотношение *Z*- и *E*-изомеров в обоих случаях 1 : 3.5 (по данным ¹H-ЯМР).

Метод Г. Суспензию аденина (1.5 г, 11 ммоль) и бис(триметилсилил)амида калия (3.11 г, 15.6 ммоль) в DMF (50 мл) перемешивали 1 ч, затем прибавляли раствор 1,2-бис(мезилокси)-3-третилоксипропана (**IVa**) (5.7 г, 5.6 ммоль) в смеси DMF (25 мл) и ацетонитрила (10 мл) и кипятили с обратным холодильником 6 ч. После охлаждения реакционную смесь обрабатывали аналогично методу А. Выход смеси целевых (**Va**) и (**VIIa**) составил 1.44 г (60%). Соотношение *Z*- и *E*-изомеров 1 : 3.5 (по данным ¹H-ЯМР).

(*Z*)-9-[3-(*tert*-Бутилдиметилсилилокси)проп-1-ен-1-ил]аденин (**Vb**): УФ (CH₃OH): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.38 + 8.10 (2 H, с + с, H8 + H2), 6.97 (1 H, д, ³J_{1,2} 9.0, H1'), 5.86 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.9, H2'), 5.86 (2 H, уш. с, 6-NH₂), 4.32 (2 H, дд, ⁴J_{1,3} 1.2, H3'), 0.88 (9 H, с, Me₃C), 0.06 (6 H, с, Me₂Si).

(*E*)-9-[3-(*tert*-Бутилдиметилсилилокси)проп-1-ен-1-ил]аденин (**VIIb**): УФ (CH₃OH): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.39 + 7.94 (2 H, с + с, H8 + H2), 7.17 (1 H, дт, ³J_{1,2} 14.3, ⁴J_{1,3} 1.9, H1'), 6.60 (1 H, дт, ³J_{2,3} 5.0, H2'), 5.86 (2 H, уш. с, 6-NH₂), 4.40 (2 H, дд, H3'), 0.92 (9 H, с, Me₃C), 0.13 (6 H, с, Me₂Si).

(*E*)-9-(3-Гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденин (**VIII**).

Метод А. Раствор (*E*)-9-(3-третилоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**VIIa**) (267 мг, 0.62 ммоль) в 80% водной уксусной кислоте (25 мл) кипятили с обратным холодильником 2 ч, охлаждали, растворители упаривали, остаток упаривали с толуолом (2 × 25 мл), растворяли в 50% водном метаноле (15 мл), промывали раствор хлороформом (2 × 15 мл) и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из 50% водного метанола, высушивали в вакууме и получали 98 мг (83%) продукта (**VIII**). УФ (CH₃OH): λ_{max} 261 нм. Т. пл. 224–227°C. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.33 (1 H, с, H8), 8.26 (1 H, с, H2), 7.18 (1 H, с, ³J_{1,2} 14.3, ⁴J_{1,3} 1.2, H1'), 6.54 (1 H, с, ³J_{2,3} 5.9, H2'), 4.40 (2 H, с, H3').

Метод Б. Раствор (*E*)-9-[3-(*tert*-бутилдиметилсилилокси)проп-1-ен-1-ил]аденина (**VIIb**) (150 мг, 0.49 ммоль) в 80% уксусной кислоте (25 мл) кипятили с обратным холодильником 2 ч, после охлаждения растворители упаривали в вакууме, остаток упаривали с толуолом (2 × 25 мл), кристаллизовали из водного метанола, высушивали в вакууме и получали 71 мг (76%) продукта (**VIII**).

(*Z*)-9-(3-Гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденин (**VI**). Раствор (*Z*)-9-(3-третилоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**Va**) (100 мг, 0.23 ммоль) в 80% водном растворе уксусной кислоты (20 мл) кипятили с обратным холодильником 2 ч, после охлаждения растворители упаривали в вакууме, остаток упаривали с толуолом (2 × 15 мл), растворяли в 50% водном метаноле (30 мл), промывали полученный раствор хлороформом (2 × 15 мл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в смеси хлороформ–ме-

танол (93 : 7) и хроматографировали на колонке с силикагелем (1 × 15.5 см). Поглощающие в УФ фракции упаривали, высушивали в вакууме и получали 34 мг (76%) продукта (**VI**). УФ (CH₃OH): λ_{max} 261 нм. Т. пл. 195–198°C. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.28 (1 H, с, H8), 8.16 (1 H, с, H2), 6.77 (1 H, дт, ³J_{1,2} 8.4, ⁴J_{1,3} 1.6, H1'), 6.02 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.06 (2 H, дд, H3').

N⁶-Диметиламинометилиден-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденин (XVI**).** Раствор (*E*)-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**VIII**) (25 мг, 0.13 ммоль) и диэтилацетата диметилформаида (400 мкл, 2.33 ммоль) в DMF (10 мл) выдерживали 18 ч при комнатной температуре, затем растворители упаривали в вакууме, остаток упаривали с водой (2 × 10 мл), растворяли в хлороформе (1 мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем (1 × 15.5 см), элюировали CHCl₃, затем смесью CHCl₃–EtOH (95 : 5). Фракции, содержащие целевой спирт, упаривали в вакууме, остаток высушивали на воздухе. Получили 30 мг (92%) продукта (**XVI**). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.92 (1 H, с, N=CH–N), 8.53 (1 H, с, H2), 8.02 (1 H, с, H8), 7.21 (1 H, уш. д, ³J_{1,2} 14.3, H1'), 6.58 (1 H, дт, ³J_{2,3} 5.6, H2'), 4.37 (2 H, дд, ⁴J_{1,3} 1.6, H3'), 3.24 + 3.19 (6 H, с + с, Me₂N).

(*E*)-9-[3-(*O*-Этилфосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (**XI**). **Метод А.** К раствору (*E*)-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**VIII**) (50 мг, 0.26 ммоль) и моноэтилового эфира йодметилфосфоновой кислоты (90 мг, 0.36 ммоль) в DMF (40 мл) прибавляли NaN (30 мг, 1.0 ммоль), перемешивали 18 ч при комнатной температуре, затем нейтрализовали уксусной кислотой (60 мкл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде (1 мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем LiChroprep RP-8 (1.8 × 22 см), элюируя водным NH₄HCO₃ (0.05 M). Фракции, содержащие целевой моноэфир, упаривали в вакууме, остаток упаривали с водой (4 × 15 мл) и высушивали в вакууме. Выход 32 мг (38%). УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.02 (1 H, с, H8), 7.87 (1 H, с, H2), 6.90 (1 H, д, ³J_{1,2} 14.3, H1'), 6.24 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.22 (2 H, д, H3'), 3.92 (2 H, д.кв, ³J_{CH₂,CH₃} ≈ ³J_{CH₂,P} 7.2, CH₃CH₂), 3.67 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.7, PCH₂), 1.20 (3 H, т, CH₃CH₂). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O): 18.17 с.

Метод Б. Раствор (*E*)-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденина (**VIII**) (50 мг, 0.26 ммоль), моноэтилового эфира тозилосиметилфосфоновой кислоты (90 мг, 0.5 ммоль) и NaN (50 мг, 1.7 ммоль) в DMF (50 мл) перемешивали 18 ч при комнатной температуре, затем нейтрализовали уксусной кислотой (100 мкл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде (1 мл), хроматографировали на колонке с силикагелем LiChroprep RP-8 (1.8 × 22 см), элюируя водным NH₄HCO₃ (0.05 M). Фракции, содержащие моноэфир (**XI**), упаривали

в вакууме, остаток упаривали с водой (4 × 15 мл), высушивали в вакууме и получали 35 мг (40%) эфира (XI).

Метод В. К раствору *N*⁶-диметиламинометилден-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденина (XVI) (30 мг, 0.12 ммоль) и моноэтилового эфира йодметилфосфоновой кислоты (60 мг, 0.24 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли NaN (25 мг, 0.83 ммоль), перемешивали 18 ч при комнатной температуре, затем нейтрализовали уксусной кислотой (60 мкл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 5% водном аммиаке, полученный раствор выдерживали при комнатной температуре 18 ч, затем растворители упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде (1 мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем LiChroprep RP-8 (1.8 × 22 см), элюируя водным NH₄HCO₃ (0.05 М). Фракции, содержащие моноэфир (XI), упаривали в вакууме, соупаривали с водой (4 × 15 мл) и лиофильно высушили. Выход 5 мг (22%).

(E)-1-(O-Этилфосфометил)-9-(3-O-этилфосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (XIV). К раствору (E)-9-(3-гидроксипроп-1-ен-1-ил)аденина (VIII) (50 мг, 0.26 ммоль) и моноэтилового эфира йодметилфосфоновой кислоты (150 мг, 0.60 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли NaN (30 мг, 1.0 ммоль), перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь нейтрализовали уксусной кислотой (60 мкл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде (1 мл) и хроматографировали на силикагеле LiChroprep RP-8 (1.8 × 22 см), элюируя водным NH₄HCO₃ (0.05 М). Фракции, содержащие диэфир (XIV), упаривали в вакууме. Получили 40 мг (35%) продукта (XIV). УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 268 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.21 + 8.14 (2 H, с + с, H8 + H2), 7.11 (1 H, д, ³J_{1,2} 14.3, H1'), 6.33 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.18 (2H, д, H3'), 3.86–3.58 (6 H, м, 2 × CH₃CH₂ + PCH₂N), 3.58 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.4, PCH₂O), 1.12 (3 H, т, ³J_{CH₂,CH₃} 6.9, CH₃CH₂ [при 3'-O]), 0.98 (3 H, т, ³J_{CH₂,CH₃} 7.2, CH₃CH₂ [при N¹]). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O): 18.17 уш. с.

(Z)-9-(3-O-Этилфосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (IX) синтезировали по методике, аналогичной описанной для фосфоната (XI), с выходом 37%. УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.04 + 8.02 (2 H, с + с, H8 + H2), 6.82 (1 H, д, ³J_{1,2} 8.4, H1'), 5.96 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.11 (2 H, д, H3'), 3.96 (2 H, д.кв., ³J_{CH₂,CH₃} ≈ ³J_{CH₂,P} 7.0, CH₃CH₂), 3.46 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.7, PCH₂), 1.22 (3 H, т, CH₃CH₂). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O): 15.82 с.

(E)-9-(3-Фосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (XII). Раствор этилового эфира (E)-9-(3-фосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина (XI) (30 мг,

0.095 ммоль) в смеси воды (20 мл), DMF (10 мл) и трибутиламина (200 мкл) упаривали в вакууме до объема ~3 мл, упаривали с DMF (4 × 10 мл), к остатку прибавляли DMF (15 мл) и Me₃SiBr (51 мкл, 0.38 ммоль) и оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Растворители упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде (1 мл) и хроматографировали на силикагеле LiChroprep RP-18 (2 × 17 см), элюируя водным NH₄HCO₃ (0.05 М). Фракции, содержащие фосфонат (XII), упаривали в вакууме и получали 22 мг (81%) продукта. УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.99 (1 H, с, H8), 7.85 (1 H, с, H2), 6.85 (1 H, д, ³J_{1,2} 14.3, H1'), 6.18 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.2, H2'), 4.14 (2 H, д, H3'), 3.51 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.7, PCH₂). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O): 15.66 с. ¹³C-ЯМР (D₂O): 157.25 (с, C6), 154.49 (с, C2), 150.00 (с, C4), 142.37 (с, C8), 125.30 (с, C1'), 120.88 (с, C2'), 120.71 (с, C5), 72.73 (д, ³J_{C,P} 12.1, C3'), 68.57 (д, ¹J_{C,P} 156.6, CP).

(Z)-9-(3-Фосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (X) получали из этилового эфира (IX) по методике, аналогичной описанной для синтеза вещества (XII), с выходом 84%. УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 261 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.00 + 7.99 (2 H, с + с, H8 + H2), 6.79 (1 H, д, ³J_{1,2} 8.4, H1'), 5.95 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.09 (2 H, д, H3'), 3.45 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.7, PCH₂). ³¹P-ЯМР (D₂O): 15.88 с. ¹³C-ЯМР (D₂O): 156.64 (с, C6), 153.81 (с, C2), 150.00 (с, C4), 143.07 (с, C8), 126.34 (с, C1'), 123.10 (с, C2'), 119.19 (с, C5), 68.39 (д, ³J_{C,P} 11.1, C3'), 66.96 (д, ¹J_{C,P} 156.6, CP).

(E)-1-(Фосфометил)-9-(3-фосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденин (XV) получали из диэтилового эфира (XIV) по методике, аналогичной описанной для синтеза вещества (XII), с выходом 76%. УФ (H₂O, pH 7): λ_{max} 269 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 8.34 + 8.32 (2 H, с + с, H8 + H2), 7.28 (1 H, д, ³J_{1,2} 14.0, H1'), 6.50 (1 H, дт, ³J_{2,3} 6.5, H2'), 4.38 (2 H, д, H3'), 3.83 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 11.8, PCH₂N), 3.73 (2 H, д, ²J_{CH₂,P} 8.7, PCH₂O). ³¹P-ЯМР (D₂O): 16.40 (с, 1P) + 16.20 (с, 1P).

Эксперименты в клеточных системах. Использовали культуру клеток Vero (клетки почек африканских зеленых марьшшек), полученных из лаборатории культуры тканей Института вирусологии РАМН. Клетки поддерживали в среде "Игла MEM", содержащей 7% эмбриональную сыворотку телят (ПАНЭКО, Москва).

Использовали эталонный штамм HSV-1/L₂, полученный из музея вирусов Института вирусологии РАМН. Мутантный штамм HSV-1/ACV^R, резистентный к ацикловиру, получали путем серийных пассажей в присутствии возрастающих концентраций ацикловира. Полученный штамм вируса был использован для получения вирусного клона, резистентного к ацикловиру [18]. Вирусные штаммы бы-

ли пассированы в смеси среды "Игла" и среды "199" (1 : 1) с добавлением 2% фетальной сыворотки телят. Для культивирования клеток и последующего инфицирования использовали 96-луночные пластиковые панели (Linbro, Flow Lab., Великобритания).

Антивирусная активность оценивалась по способности исследуемых соединений ингибировать развитие вирусиндуцированного цитопатогенного на 50 и 95% по сравнению с полной гибелью клеток в контрольных инфицированных культурах [19]. Множественность инфицирования составляла 0.1 ЦТД₅₀/кл. Клетки инкубировали в течение 48 ч, когда в контроле вируса развивался 95–100% цитотоксический эффект.

Для оценки цитотоксичности использовали особенность мертвых клеток окрашиваться трипановым синим [20]. За величину ЦТД₅₀ принимали ту концентрацию соединения, при которой выживаемость клеток через 72 ч контакта с изучаемыми соединениями составляла 50%.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 04-04-49354) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Фундаментальные науки – медицине".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Qiu Y.-L., Ksebatl M.B., Ptak R.G., Fan B.Y., Breitenbach J.M., Lin J.-S., Cheng Y.-C., Kern E.R., Drach J.C., Zemlicka J. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 10–23.
2. Ryback R.J., Hartline C.B., Qiy Y.-L., Zemlicka J., Harden E., Marshall G., Somadossi J.-P., Kern E.R. // *Antimicrob. Agents Ch.* 2000. V. 44. P. 1506–1511.
3. Uchida H., Kodama E.N., Yoshimura K., Maeda Y., Kosalaraksa P., Maroun V., Qiu Y.-L., Zemlicka J., Mitsuya H. // *Antimicrob. Agents Ch.* 1999. V. 43. P. 1487–1490.
4. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., Holy A. // *Antivir. Res.* 1987. V. 8. P. 261–272.
5. De Clercq E. // *J. Clinical Virology.* 2001. V. 22. P. 73–89.
6. Phadtare Sh., Zemlicka J. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 43–46.
7. Holy A. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1989. V. 54. P. 446–454.
8. Holy A., Rosenberg I. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1982. V. 47. P. 3447–3463.
9. Dyatkina N.B., Theil F., Janta-Lipinski M. // *Tetrahedron.* 1995. V. 51. P. 761–772.
10. Jasko M.V., Tarusova N.B. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1993. V. 58. P. 105–106.
11. Ясько М.В., Новиков Н.А., Тарусова Н.Б. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 50–54.
12. Kim C.U., Luh B.Y., Misco P.F., Bronson J.J., Hitchcock M.J.M., Ghazzouli I., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 2481–2487.
13. Jie L., van Aershot A., Balzarini J., Janssen G., Busson R., Hoogmartens J., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 2481–2487.
14. Jahne G., Muller A., Kroha H., Rosner M., Holzhauser O., Meichsner Ch., Helsenberg M., Winkler I., Reib G. // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. P. 5335–5338.
15. Morfin F., Thouvenot D. // *J. Clinical Virology.* 2003. V. 26. P. 29–37.
16. Семизаров Д.Г., Ясько М.В., Куханова М.К., Краевский А.А. // *Молекуляр. биол.* 1995. Т. 29. С. 689–700.
17. Вейганд-Хильгетмаг. Методы эксперимента в органической химии: Пер. с нем. М.: Химия, 1969.
18. Галегов Г.А., Шобухов В.М., Леонтьева Н.А., Ясько М.В. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 906–909.
19. 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.
20. Holy A., De Clercq E., Votruba I. // *Phosphonylmethyl Esters of Nucleosides and their Acyclic Analogues* / Ed. J.C. Martin. Washington: Acad. Press, 1989. P. 50–71.

Synthesis and Antiherpetic Activity of (Z)- and (E)-Isomers of 9-(3-Phosphonomethoxyprop-1-en-yl)adenine

A. V. Ivanov[#], V. L. Andronova^{**}, G. A. Galegov^{**}, and M. V. Jasko^{*}

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

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

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

9-(3-Phosphonomethoxyprop-1-en-yl)adenine (Z)- and (E)-isomers were synthesized. The stereoselectivity of double bond formation was studied by variation of sulfonyl groups. The resulting phosphonates exhibited a moderate antiherpetic activity in a culture of Vero cells infected with herpes simplex type 1 virus. The Z-isomer was shown to be more effective inhibitor of virus reproduction in the case of both wild and acyclovir-resistant strain. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: herpes simplex virus, nucleotides, phosphonates