

УДК 577.113.3.017

НОВЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДОВ И ИХ 5'-ТРИФОСФАТЫ: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Н.А. Голубева¹, А.В.Иванов^{1,2}, М.А. Иванов¹, О.А. Батюнина¹, А.В. Шипицын¹,
В.Л. Туницкая¹, Л.А. Александрова¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта; e-mail: ala2004@zmail.ru;

²Университет Осло, Центр медицинских исследований в России)

Синтезирован ряд бициклических фурано- и пирроло[2,3-*D*]пиримидиновых нуклеозидов и модифицированных по N¹ атому и/или 6 положению пуриновых нуклеозидов. Среди нетоксичных бициклических нуклеозидов и N⁶-карбоксиялкаладенозинов только фуранопиримидин с заместителем C₁₀H₂₁ и N⁶-карбоксиметиладенозин проявили умеренную анти-ВГС активность в системе репликаона вируса, а N¹-гидроксиинозин - высокую анти-ВГС активность и высокую токсичность. Синтезированы 5'-О-трифосфаты полученных нуклеозидов и изучены как субстраты/ингибиторы ферментов ВПГ: РНК-зависимой РНК-полимеразы и NTP-зависимой РНК-хеликазы.

Вирус гепатита С (ВГС) относится к наиболее широко распространенным и опасным инфекциям [1, 2]. К настоящему времени известно всего несколько типов низкомолекулярных ингибиторов репликации ВГС, что делает актуальным поиск новых агентов анти-ВГС. В настоящей работе представлен синтез новых аналогов рибонуклеозидов, проверка их активности как ингибиторов репродукции ВГС в системе ВГС-репликаона, а также синтез 5'-О-трифосфатов полученных нуклеозидов и изучение их как субстратов/ингибиторов нуклеотид-зависимых ферментов ВГС: белков NS5B (РНК-зависимой РНК-полимеразы) и NS3 (NTP-зависимой РНК-хеликазы).

Нами была разработана схема получения N¹-гидроксиинозина (**7a**) в препаративных количествах окислением коммерчески доступного аденозина (**5a**) *m*-хлорнадбензойной кислотой [7], с последующим дезаминированием аденозин N¹-оксида (**6a**) нитритом натрия в кислой среде (схема 1) с выходом 45% (на две стадии). Ранее N¹-гидроксиинозин (**7a**) получали окислением *m*-хлорнадбензойной кислотой инозина (**8**) N⁶-морфолинилпуририбозиды (**9**) и N⁶,N⁶-диметиладенозина (**11**) (выходы 24, 10 и <5%) [8]. Образование N¹-гидроксиинозина (**7a**) можно объяснить либо последовательным, либо одновременным окислением по N¹ положению и N⁶-экзоциклической группе пурина с образованием промежуточного соединения (**10**).

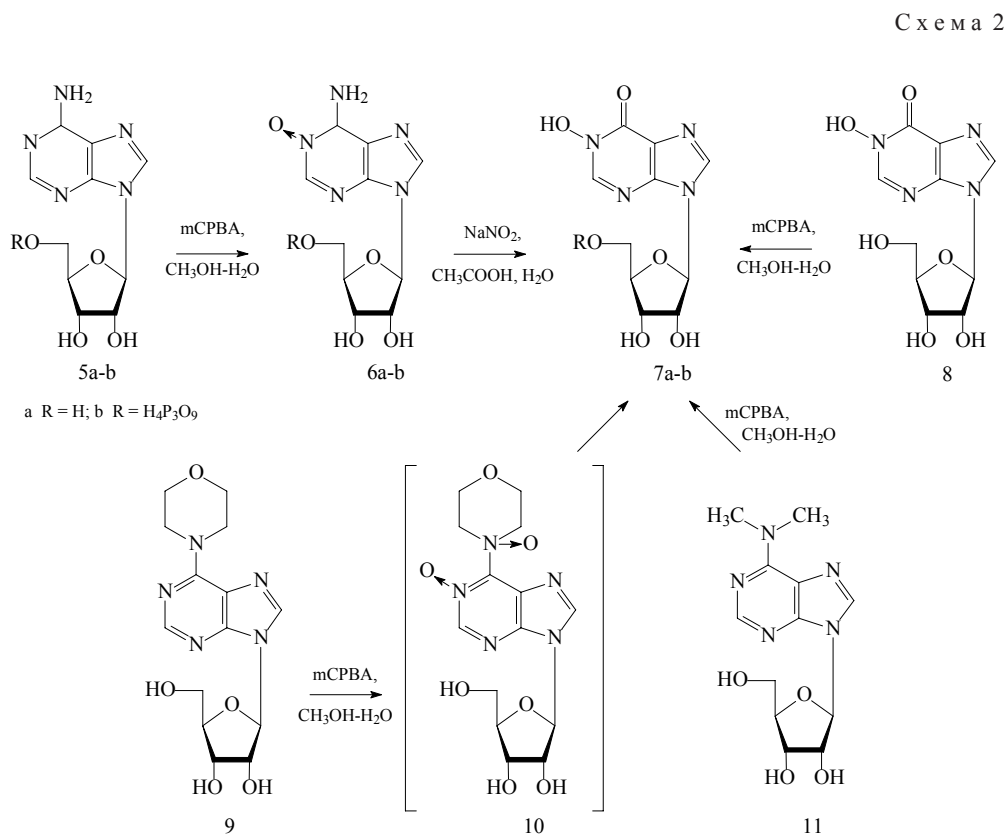
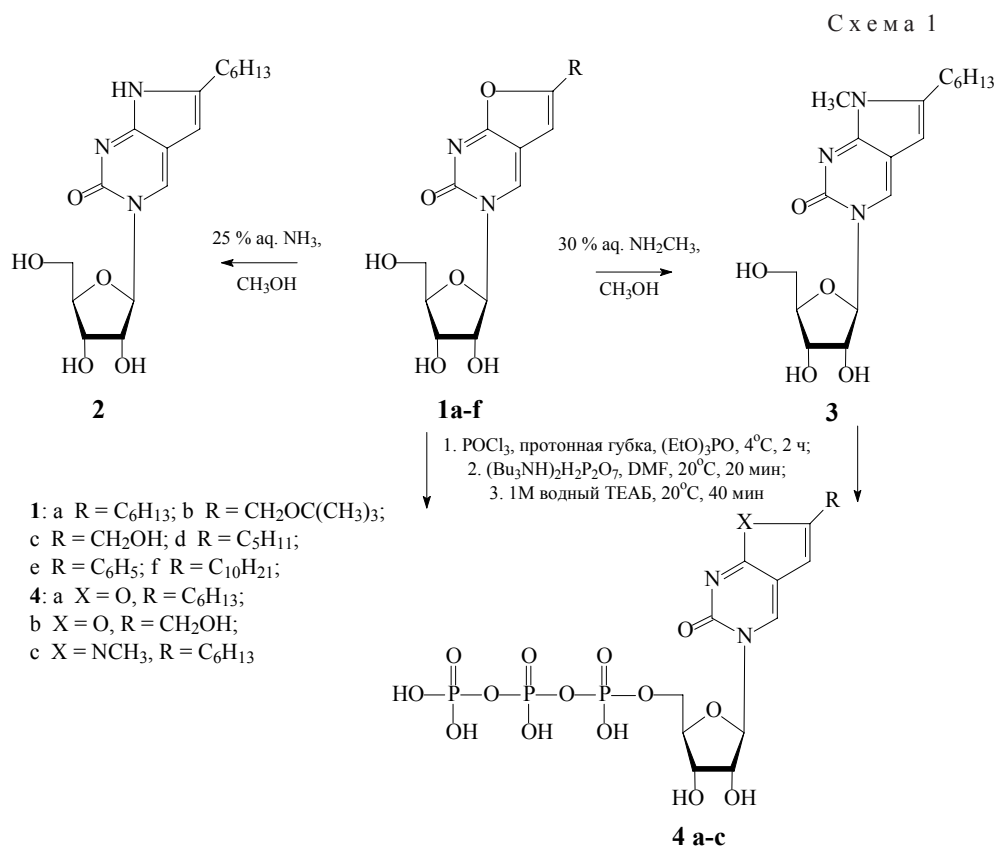
В литературе [9] широко представлены N⁶-замещенные производные аденозина, тем не менее аналогов с анионной группой (цвиттер-ионных структур) не описано; N⁶-карбоксиялкаладенозины (**13a-c**) синтезированы нами из 6-хлорпуририбозиды (**12**) реакцией с

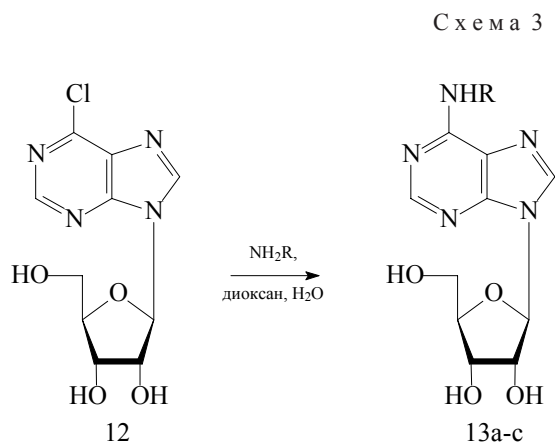
соответствующей аминокислотой в присутствии N-этилдиизопропиламина (схема 1, 2). В безводной среде реакция практически не идет. Однако применение в качестве растворителя 20%-го водного диоксана позволило получить соединения (**13a-c**) с практически количественными выходами.

Спектры ЯМР ¹H, ¹³C и ³¹P регистрировали на спектрометре "Bruker AMXIII-400" с рабочей частотой 400, 133 и 162 МГц в D₂O. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфонокислоты. Анализ методом ТСХ проводили на пластинках "Kieselgel 60 F₂₅₄" в разных системах. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu UV-2401 PC" в воде (рН 7).

Культивирование репликаона ВГС и определение его относительного титра при изучении свойств соединений проводили, как описано в работе [10]. Токсичность соединений в культуре клеток *Huh7* определяли, используя МТТ ("Sigma", США) [10].

N¹-гидроксиинозин (7a). К раствору 2,68 г (1 ммоль) аденозина в 50 мл 50%-го водного метанола при перемешивании добавляли 3,44 г (2 ммоль) *m*-хлорнадбензойной кислоты. Через 24 ч добавляли еще 3,44 г (2 ммоль) *m*-хлорнадбензойной кислоты и перемешивали 24 ч. Реакционную массу упаривали в вакууме, растворяли в воде и экстрагировали этилацетатом. Водную фракцию очищали методом обращено-фазовой хроматографии на колонке с "LiChroprep RP-18" (50×400 мм), лиофилизировывали из воды и получали 2 г аденозин N¹-оксида (**6a**). К раствору 2 г (0,7 ммоль) соединения (**6a**) в 50 мл воды добавляли





a R = CH₂COOH; b R = CH₂CH₂COOH; c R = CH(CH₃)COOH

11 мл (2 ммоль) уксусной кислоты и 13,8 г (2 ммоль) нитрита натрия. Перемешивали 2 сут, добавляли еще 6,9 г (1 ммоль) нитрита натрия, перемешивали 3 сут, упаривали в вакууме и очищали методом обращено-фазовой хроматографии на колонке с "LiChroprep RP-18" (50×400 мм). Продукт лиофилизывали из воды. Общий выход 1,28 г (45%) (физико-химические характеристики полностью совпадали с литературными [8]).

N⁶-карбоксиялкиладенозины (13 а-с). К раствору 50 мг (0,17 ммоль) 6-хлорпуририбозида (**12**) в 1 мл водного диоксана добавляли 300 мкл (1,74 ммоль) N-этилдиизопропиламина и 78 мг (0,87 ммоль) β-аланина, 65 мг (0,87 ммоль) глицина или 78 мг (0,87 ммоль) аланина, выдерживали 2 сут при 37°C и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 1 мл воды и очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с "LiChroprep RP-18" (20×200 мм) в линейном градиенте концентрации метанола (0→20%, V = 400 мл) в 0,02 М водном NH₄HCO₃. Продукты лиофилизывали из воды. Выход составил 95%.

N⁶-(2-карбоксиитил)аденозин (13а). УФ: λ_{макс} = 267 нм (ε = 16100). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.; КССВ, Гц): 8.09 и 8.01 (2с, 2H, H-2 и H-8); 5.87 (д, 1H, H1', J 5.9); 4.63 (т, 1H, H2', J 5.6); 4.31 (~т, 1H, H3', J 5.6); 4.16 (~к, 1H, H4', J 2.8); 3.81 (дд, 1H, H5'a, J 2.8 и 12.9); 3.72 (дд, 1H, H5'b, J 3.6 и 12.9); 3.56 (уш.с., 2H, CH₂N); 2.46 (т, 2H, CH₂COOH, J 6.9). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): 178.62 (COOH); 159.14 (C-6); 149.54 (C-4); 153.52 (C-2); 140.93 (C-8); 119.61 (C-5); 89.46 (C-1'); 86.75 (C-4'); 74.88 (C-3'); 71.70 (C-2'); 62.64 (C-5'); 37.84 (C-COOH и C-NH).

N⁶-карбоксиметиладенозин (13б). УФ: λ_{макс} = 266 нм (ε = 15300). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.; КССВ,

Гц): 8.14 и 8.03 (2с, 2H, H-2 и H-8); 5.91 (д, 1H, H1', J 5.9); ~4.8 (сигнал H2' частично перекрывается сигналом HOD); 4.33 (~т, 1H, H3', J 4.2); 4.18 (~к, 1H, H4', J 3.1); 3.97 (уш.с., 2H, CH₂N); 3.83 (дд, 1H, H5'a, J 2.7 и 12.9); 3.74 (дд, 1H, H5'b, J 3.7 и 12.9). Спектр ЯМР ¹³C (γ, м.д.): 173.49 (COOH); 159.25 (C-6); 149.81 (C-4); 152.90 (C-2); 140.47 (C-8); 119.65 (C-5); 88.87 (C-1'); 86.13 (C-4'); 74.19 (C-3'); 71.03 (C-2'); 61.98 (C-5'); 44.93 (C-N).

N⁶-(1-карбоксиитил) аденозин (13с). УФ: λ_{макс} = 268 нм (ε = 14800). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.; КССВ, Гц): 8.11 и 8.01 (2с, 2H, H-2 и H-8); 5.89 (д, 1H, H1', J 5.9); ~4.8 (сигнал H2' частично перекрывается сигналом HOD); 4.32 (~т, 2H, H3' и CH, J 4.2); 4.18 (~к, 1H, H4', J 2.8); 3.83 (дд, 1H, H5'a, J 2.5 и 12.9); 3.74 (дд, 1H, H5'b, J 3.6 и 12.9); 1.41 (д, 3H, CH₃, J 7.2). Спектр ЯМР ¹³C (δ, м.д.): 176.42 (COOH); 159.13 (C-6); 149.61 (C-4); 152.76 (C-2); 140.18 (C-8); 119.51 (C-5); 88.73 (C-1'); 85.94 (C-4'); 74.11 (C-3'); 70.89 (C-2'); 61.83 (C-5'); 52.18 (C-N); 18.38 (CH₃).

5'-трифосфат N¹-гидроксиинозина (7б) синтезировали из 5'-трифосфата аденозина (**5б**) методом, описанным выше для нуклеозида. УФ: λ_{макс} = 232 нм (ε = 35000), 261 нм (ε = 8500). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д.; КССВ, Гц): 8.48 и 8.46 (2с, 2H, H-2 и H-8); 6.01 (д, 1H, H1', J 4.6); ~4.8 (сигнал H2' частично перекрывается сигналом HOD); 4.46 (уш.с, 1H, H3'); 4.26 (уш.с, 1H, H4'); 4.12 (м, 2H, H5'). Спектр ЯМР ³¹P (δ, м.д.): -6.44 (уш.с, 1P, P_α); -10.64 (с, 1P, P_γ), -21.50 (уш.с, 1P, P_β).

Бициклические фурано[2,3-D]пиримидиновые нуклеозиды (**1а-ф**) синтезированы взаимодействием 5-иодуридина с терминальными алкинами в присутствии каталитических количеств Pd (0) и CuI [3, 4] анало-

Цитотоксичность в культуре клеток *Huh7* и противовирусный эффект полученных соединений в системе репликона ВПГ.

Соединение	ЦД ₅₀ , мкМ	ИД ₅₀ , мкМ
1a-e, 2, 3	>500	не активны
1f	>500	30
7a	20	2–3
13a	100	30–50
13b,c	>500	не активны
2'MeC *	>200	1,23
4'N ₃ C *	>33	1,28

*Данные приведены в статье [11]; ЦД₅₀ – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% культивируемых клеток; ИД₅₀ – концентрация соединения, на 50% подавляющая репликацию вируса

гично методу, предложенному ранее для получения соответствующих 2'-дезоксинуклеозидов [5, 6]. Обработка нуклеозида **1a** водно-спиртовыми растворами аммиака или метиламина (схема 1) привела к пирроло- и N⁷-метилпирроло[2,3-*D*]пиримидиновым нуклеозидам (**2**) и (**3**) соответственно [3, 4].

Синтезированные нуклеозиды были испытаны как потенциальные ингибиторы репликации ВГС в системе репликона вируса [10] (таблица). Соединения (**1-3**) и (**13b,c**) оказались неактивны в этой системе и не обладали цитотоксичностью в концентрации до 500 мкМ в культуре гепатоцитов человека *Huh7*. Лишь бициклический нуклеозид (**1f**), содержащий заместитель C₁₀H₁₂, и N⁶-карбоксиметиладенозин (**13a**) проявили умеренную анти-ВГС активность. В ряду N⁶-производных (**13**) только N⁶-карбоксиметиладенозин (**13a**) проявил умеренную токсичность. N¹-Гидроксиинозин (**7a**) продемонстрировал высокую анти-ВГС активность и высокую токсичность в культуре клеток *Huh7*.

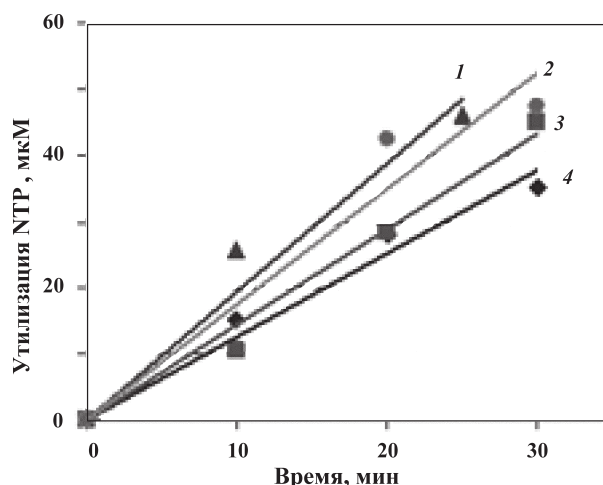
Механизм противовирусного действия большинства аналогов нуклеозидов включает их энзиматическое превращение в нуклеозид 5'-трифосфаты с последующим встраиванием в 3'-конец вирусной ДНК или РНК, что приводит к ингибированию репликации вируса [12, 13]. Для поиска возможной мишени полученных нуклеозидов мы синтезировали ряд 5'-О-трифосфатов и исследовали их субстратную специфичность по отношению к ферментам ВГС: белки NS5B и NS3.

По методу [14] (схема 1) синтезировали 5'-трифосфаты (**4a-c**) действием POCl₃ в триэтилфосфате в присутствии протонной губки с последующей конденсацией с трибутиламмониной солью пиродифосфорной кислоты. Выходы составляли 5–14% [3, 4]. 5'-Трифосфат N¹-гидроксиинозина (**7b**) был получен в две стадии окислением коммерчески доступного 5'-трифосфата аденозина (**5b**) с последующим дезаминированием 5'-трифосфата аденозин N¹-оксида (**6b**) (схема 2).

5'-Трифосфаты бициклических нуклеозидов (**4a-c**) не узнавались РНК-полимеразой ВГС и проявляли крайне слабые ингибиторные свойства АТРазной реакции, катализируемой НТРазой ВГС, однако оказались сравнительно эффективными субстратами НТРазы (рисунок). Их активность лишь немногим уступала активности природного УТР [3, 4]. Различия в скоростях гидролиза и могло обуславливать наличие низкой псевдо-ингибирующей активности этих соединений. В то же время 5'-трифосфат N¹-гидроксиинозина (**7b**) заметно ингибировал АТРазную реакцию, катализируемую НТРазой ВГС (*Ki* 109 мкМ).

Приведенные выше данные указывают на необходимость дальнейшего изучения зависимости структура/анти-ВГС активность этих групп соединений для более точной оценки перспективности их использования в качестве ингибиторов ВПГ.

Авторы благодарны А.О. Кузякину (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН) за предоставление белка NS3 ВГС.



Гидролиз трифосфатов бициклических нуклеозидов и УТР, катализируемый NTP-зависимой РНК-хеликазой: 1 – УТР; 2 – 4b; 3 – 4c; 4 – 4a. Соединения (200 мкМ) инкубировали 5–30 мин с 0,2 мкг белка NS3 при 37°C в 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 25 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂ и 1,5% (v/v) глицерина. Анализ продуктов проводили с помощью ВЭЖХ (колонка “Lichrosorb-NH2”, 4×150 мм, 6 мкм) или ТСХ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантов РФФИ №05-04-49492, 05-04-49500 и 04-04-49621.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Wasley A., Alter M.J. // *Semin. Liver Dis.* 2000. **20**. P. 1.
2. Rosen H.R., Gretch D.R. // *Mol. Med. Today.* 1999. **5**. P. 393.
3. Alexandrova L.A., Ivanov M.A., Victorova L.S., Kukhanova M.K. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2007 (в печати).
4. Иванов М.А., Иванов А.В., Красницкая И.А., и др. // *Биоорг. химия.* 2007 (в печати).
5. Robins M.J., Barr P.J. // *J. Org. Chem.* 1983. **48**. P. 1854.
6. McGuigan C., Yarnold C.J., Jones G. et al. // *J. Med. Chem.* 1999. **42**. P. 4479.
7. Kwong C.D., Krauth C.A. et al. // *Nucleosides & Nucleotides.* 1998. **17**. P. 1409.
8. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Shipitsin A.V. et al. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006. **71**. P. 1107.
9. Gao Z.G., Blaustein J.B., Gross A.S. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 2003. **65**. P. 1675.
10. Lohmann V., Korner F., Herian U. et al. // *Science.* 1999. **285**. P. 110.
11. Klumpp K., Leveque V., Le Pogam S. et al. // *Biol. Chem.* 2006. **281**. P. 3793.
12. De Clercq E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. **1587**. P. 258.
13. De Clercq E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. **1**. P. 13.
14. Kovacs T., Otvos L. // *Tetrahedron Lett.* 1988. **29**. P. 4525.

Поступила в редакцию 23.11.07

NOVEL RIBONUCLEOSIDE ANALOGUES AND THEIR 5'-O-TRIPHOSPHATES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES

N.A. Golubeva, A.V. Ivanov, M.A. Ivanov, O.A. Batyunina, A.V. Shipitsyn, V.L. Tunitskaya, L.A. Alexandrova

(Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS; University of Oslo, Centre for Medical Studies in Russia)

Bicyclic furano- and pyrrolo[2,3-*D*]pyrimidines and modified at N¹ and/or 6 position purine nucleotides were synthesized. Among the tested non toxic bicyclic nucleosides and N⁶-alkyladenosines only [2,3-*d*]furopyrimidine with C₁₀H₂₁ substituent and N⁶-alkyladenosine showed moderate anti-HCV activity in a replicon system, and N¹-hydroxyinosine demonstrated high anti-HCV activity and significant cytotoxicity. The corresponding nucleoside 5'-triphosphates were synthesized and studied as substrates/inhibitors of HCV NS5B protein (RNA-dependent RNA polymerase) and NS3 protein (RNA helicase/NTPase).