



СИНТЕЗ НОВЫХ БИС-НУКЛЕОЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ С ВЫСОКО ВЫРАЖЕННОЙ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Сольев П.Н.* , Ясько М.В.#



* Высший Химический Колледж РАН;

Лаборатория химического и биологического анализа биополимеров и клеток, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
ВХК РАН: тел. (499) 978-85-20; E-mail: decanatVXK@yandex.ru; ЛХБА ИМБ РАН: тел. (499) 135-60-65; факс (499) 135-14-05; E-mail: lhba-imb@mail.ru

Данная работа является продолжением ранее выполненных нами работ по поиску новых депо-форм в ряду нуклеозидных аналогов.

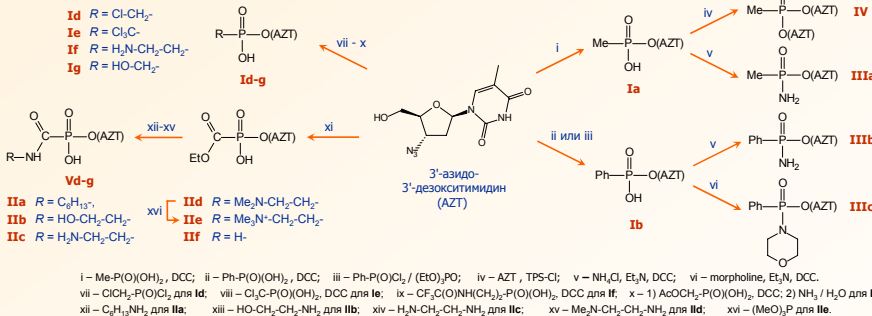
Целью работы на данном этапе стало дальнейшее расширение ряда, получение, определение состава и исследование фармакологических свойств анионных фосфонатов, нового класса бис-О,О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил) производных и смешанных фосфонатных диэфиров L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина (ЗТС) и 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT).

Актуальность работы

Роль противовирусных препаратов постоянно возрастает из-за угроз эпидемий, вызванных вирусными инфекциями. В медицинской практике используется целый ряд соединений, обладающих противовирусной активностью в отношении ВИЧ. Длительное применение нуклеозидных ингибиторов приводит к большому количеству токсических эффектов и достаточно быстро формированию резистентных штаммов вируса.

Одним из способов улучшения фармакокинетических свойств противовирусных агентов является создание их депо-форм – производных, которые после попадания в организм подвергаются химическим или ферментативным биотрансформациям, высвобождая активное соединение. Н-фосфонат AZT (Никавир®), созданный в ЛХБА ИМБ РАН и одобренный в России для терапии синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), менее токсичен, чем AZT. Предпринимается поиск новых более активных, стабильных и менее токсичных депо-форм.

Предыдущий этап синтеза

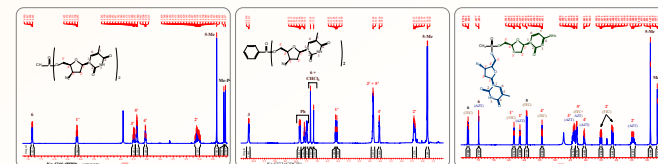


Антивирусная активность полученных веществ

Соединение	ЦД ₅₀ , мМ	ЦД ₉₉ , мМ	ИС
Iа*	>14,5	0,93	>1560
IVб	>260	>2,58	>10000
IVб		>10	
IVс		>10	
IVд		0,18	
AZT	0,08	0,037	2162
Никавир	0,18	0,131	1404

ИД₅₀ 50%-ная цитотоксическая доза для незараженных клеток МТ-4 (при которой рост клеток подавляется на 50%)
ИД₉₉ концентрация вещества, при которой количество вируса уменьшается на 50%
ИС – индекс селективности, отношение токсичности к активности ИД₅₀/ИД₉₉

Антивирусную активность синтезированных фосфонатов исследовали на клетках МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, штамм ГКВ-4046 в ГНЦ «Вектор» Министерства здравоохранения РФ (Новосибирск). Способность исследуемых веществ подавлять репродукцию вируса оценивали, измеряя концентрацию вирусного антигена р24. Вещества вносили после адсорбции вируса.



Литература

De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nature*, 2004, 2, 704-711.
Хорлин А.А., Тарусова Н.Б., Дятлова Н.Б., Краевский А.А., Библишвили Р.Ш., Галегов Г.А., Жданов В.М., Корнеева М.Н., Ноозг Д.Н., Майорова С.Н., Шобухов В.М., 5-Фосфонаты 2,3-дидезокси-нуклеозидов, Патент РФ 1548162, 8.11.1989.
Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandzhinskaya A.L., Yanarev D.V., Skoblov Yu.S., Pronayeva T.R., Feduk N.V., Pokrovsky A.G., Kulkhanova M.K. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, 22, №4-8, 951-965.
Юрич О.Г., Краевский А.А., Афонина Л.Ю., Багларянн В.А., Букова Н.В., Воронин Е.Е., Колесник А.Н., Молдуров И.Б., Мошквич Г.Ф., Покровский В.В. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, 2001, №1, 43-45.
Широкоев Е.А., Ясько М.В., Ханджинская А.Л., Иванов А.В., Янаев Д.В., Соболев Ю.С., Проняева Т.Р., Федок Н.В., Покровский А.Г., Куханова М.К. *Вопросы химии*, 2004, 30, №3, 273-280.
Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandzhinskaya A.L., Yanarev D.V., Skoblov Yu.S., V.A. Mtkhevich, E.V. Bocharov, Pronayeva T.R., Feduk N.V., Kulkhanova M.K., Pokrovsky A.G., *J. Med. Chem.*, 2004, 47, №14, 3696-3614.
Griengl H., Hayden W., Penn G., De Clercq E., Rosenwith B. *J. Med. Chem.*, 1988, 31, №9, 1831-1839.
Ясько М.В., Шилицын А.В., Ханджинская А.Л., Широкоев Е.А., Сольев П.Н., Плясунова О.А., Покровский А.Г. *Вопросы химии*, 2006, 32, №6, 603-608.

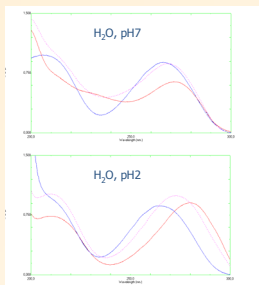
Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 05-04-49500. Авторы выражают свою благодарность д.б.н. М.К. Кухановой и к.с.н. А.В. Шилицыну за помощь и рецензирование работы, а также Карпенко И.П. за анализ гидротермической стабильности веществ в плазме крови.

В ходе работы синтезированы новые производные фосфоновых кислот:

- 1) анионные моноэфиры (Ia-f),
- 2) аминокарбонил фосфонаты (IIa-f),
- 3) амиды фосфонатов нуклеозидов (IIIa-c),
- 4) бис-О,О'-(3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил) производных (IVa-d) и
- 5) смешанных фосфонатных диэфиров L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина и 3'-азидо-3'-дезокситимидина (Va-c).

Исследование

Неизменность нуклеинового основания в процессе химического синтеза подтверждается УФ-спектроскопией, а гомогенность синтезированных соединений – данными ТСХ и ¹H-, ¹³C- и ³¹P-ЯМР-спектроскопии.



УФ-спектры	
№	Wavelength
Ia	266,1 nm
Va	268,1 nm
VI	271,5 nm

УФ-спектры	
№	Wavelength
Ia	264,2 nm
Va	272,9 nm
VI	279,8 nm

В таблице представлены данные ³¹P-ЯМР спектров. Можно выявить закономерности в изменении химических сдвигов в зависимости от типа структуры.

№ соединения (растворитель)	R	X	δ _p
Ia (D ₂ O)	Me-		27,34
Ib (CD ₃ OD)	Ph-		15,49
Ih (D ₂ O)	I-CH ₂ -	-OH	17,00
Ii (D ₂ O)	N ₃ -CH ₂ -		17,21
IVa (CD ₃ OD)	Me-		35,60
IVb (CD ₃ OD)	Ph-		18,77
IVc (DMSO-d ₆)	I-CH ₂ -	-O(AZT)	26,19
IVd (DMSO-d ₆)	N ₃ -CH ₂ -		25,06
Va (CD ₃ OD)	Me-		35,17 & 35,78
Vb (CD ₃ OD)	Ph-		25,33 & 24,78
Vc (CD ₃ OD)	I-CH ₂ -	-O(ЗТС)	25,61 & 25,13

Кроме того, для смешанных нуклеозидных производных Va,b,c наблюдаются 2 диастереомера с различными химическими сдвигами и неодинаковыми интенсивностями.

Выводы и результаты работы

- Были получены, очищены и охарактеризованы три класса нуклеозидных производных – анионные фосфонатные производные, бис-AZT эфиры и смешанные фосфонаты AZT и ЗТС.
- Оформление патента на бис-нуклеозидные фосфонатные производные с противовирусной активностью находится в стадии регистрации, относится к области молекулярной биологии, вирусологии и медицины.
- Фармакокинетические свойства изучены в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Министерства здравоохранения РФ (Новосибирск) и проведены исследования кинетики на животных.
- Синтезированные соединения являются низко токсичными депо-формами нуклеозидов с высоко выраженной противовирусной активностью, обладающими способностью постепенно высвобождать активные нуклеозиды в организме, что являлось целью данной работы.