



УДК 542.06;54.057;615.281.8

НОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ 3'-АЗИДО-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИНА И 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-ТИАЦИТИДИНА НА ОСНОВЕ 1,3-(ДИПАЛЬМИТОИЛАМИНО)ПРОПАН-2-ОЛА: СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИ-ВИЧ-АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

© 2025 г. Е. С. Дарнотук*,[#], А. Э. Синявин**, М. Н. Чудина*, Н. С. Шастина*

* МИРЭА – Российский технологический университет (ИТХТ им. М.В. Ломоносова),
Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

** Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России),
Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

Поступила в редакцию 05.05.2025 г.

После доработки 24.05.2025 г.

Принята к публикации 25.05.2025 г.

Разработка пролекарств противовирусных нуклеозидов с изостерными производными природных липидов позволяет повысить биодоступность данных препаратов, модулировать эффективность их действия. В данной работе с использованием Н-фосфонатного метода осуществлен синтез новых липофильных пролекарств 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT), 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина (ЗТС) на основе 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола с функциональными фосфорными связями. Проведены исследования анти-ВИЧ-активности синтезированных соединений в отношении различных штаммов ВИЧ (HIV-1 MVP-899, HIV-1 RF) и цитотоксичности в отношении клеток МТ-4. Н-фосфонатдиэфирные и фосфодиэфирные конъюгаты проявили более низкую анти-ВИЧ-активность, чем исходные нуклеозиды ($EC_{50} = 0.59\text{--}3.04$ мкМ), их преимущества включают низкую цитотоксичность ($CC_{50} > 100$ мкМ). Противовирусная активность амидофосфатных производных с эфирами L-α-аланина снижалась в ряду (Bu) > Me > (iPr) > Et, значения EC_{50} при этом составили 0.46, 4.60, 8.97 и 12.55 мкМ соответственно, эти соединения проявляли цитотоксичность, сходную с AZT ($CC_{50} > 50$ мкМ). Дополнительным преимуществом таких конъюгатов может служить возможность направленного транспорта в резервуары ВИЧ за счет энтероцит-опосредованного лимфатического транспорта, а также потенциального внутриклеточного высвобождения нуклеозидмонофосфата, что позволяет обойти первичное фосфорилирование нуклеозидов при их метаболизме до активной трифосфатной формы. Следовательно, разработка таких пролекарств может послужить основой для поиска лекарств с высокой эффективностью.

Ключевые слова: анти-ВИЧ-нуклеозиды, пролекарства, амидные изостеры, Н-фосфонатный метод, амидофосфаты, эфиры аминокислот

DOI: 10.7868/S1998286025060062

Сокращения: ЗТС – 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин; AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; CC_{50} – цитотоксическая концентрация, вызывающая гибель 50% клеток; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; EC_{50} – эффективная концентрация, вызывающая ингибирование вирусного цитопатического действия на 50%; NAs – нуклеозидные аналоги; Nuc – нуклеозид; Nuc-MP – нуклеозидмонофосфат; Nuc-TP – нуклеозидтрифосфат; SI – индекс селективности; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ОТ – обратная транскриптаза; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита человека.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (929) 640-67-32; эл. почта: Mslizirichi@yandex.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность ВИЧ-инфекции продолжает оставаться на высоком уровне, по данным на 2024 г. ~39.9 миллионов человек во всем мире заражены ВИЧ [1]. В настоящее время разработаны и применяются на практике различные лекарственные препараты для лечения данного заболевания, тем не менее появление множественной лекарственной устойчивости к применяемым в терапии соединениям по-прежнему остается серьезной проблемой. Поэтому разработка новых препаратов с улучшенными фармакологическими свойствами для борьбы с этим вирусом актуальна в наши дни [2, 3].

Ключевой этап жизненного цикла ВИЧ – процесс обратной транскрипции, катализируемый ферментом обратной транскриптазой (ОТ), которая осуществляет биосинтез цепи ДНК на основе геномной вирусной РНК. Среди одобренных FDA препаратов, нацеленных на различные стадии жизненного цикла ВИЧ-1, число нуклеозидных ингибиторов ОТ самое большое, что свидетельствует об их важности.

Азидотимидин (AZT) представляет собой аналог тимидина с азидогруппой в 3'-положении. Первоначально AZT был синтезирован как противоопухолевый препарат, но в 1987 г. был одобрен в качестве ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1. Ламивудин (ЗТС) представляет собой аналог дезоксицитидина, в котором углерод в 3'-положении заменен серой [4, 5]. В клетках данные нуклеозидные аналоги (NAs) метаболизируются до активной формы Нус-трифосфата. Отсутствие гидроксильной группы в 3'-положении приводит к тому, что обратная транскриптаза ВИЧ-1 при включении этих NAs в качестве субстрата не способна катализировать дальнейшие реакции удлинения цепи ДНК.

Несмотря на высокую эффективность данных препаратов, они также обладают и рядом существенных недостатков, к которым относится возникновение перекрестной резистентности, побочных эффектов, а также их низкая биодоступность [6–8]. По этим причинам модификация применяемых на практике соединений, направленных против ВИЧ, по-прежнему остается важной задачей медицинской химии, которая позволит улучшить эффективность, селективность и фармакокинетические свойства данных препаратов, уменьшить побочные эффекты, а также

оказывать направленное действие на новые терапевтические мишени.

Ограничения в использовании существующих нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) побудили к разработке стратегий создания пролекарств на их основе. В основе пролекарственного подхода лежит специфичная конструкция соединений, которая позволяет им проходить мембранный или метаболический барьер и, пройдя его, высвобождать фармакофор посредством постбарьерных ферментативных или неферментативных процессов. Поскольку проникновение через мембраны считается важным условием, пролекарство НИОТ должно обладать требуемой липофильностью [9]. Однако в случае антиретровирусных препаратов чрезвычайно важна возможность избирательного действия на резервуары ВИЧ (макрофаги, моноциты, дендритные клетки) для предотвращения нежелательных эффектов. В дополнение к селективной доставке в резервуары ВИЧ, пролекарство НИОТ должно обладать достаточной химической стабильностью в условиях физиологических сред организма и уменьшать или устранять недостатки исходных лекарственных препаратов [10].

Создание сложноэфирных производных – один из наиболее частых подходов при получении пролекарств. Так, 5'-О-замещенные пролекарства НИОТ позволяют зачастую повысить анти-ВИЧ-активность и проницаемость через клеточные барьеры, приводят к изменению фармакокинетических свойств, увеличивая период полувыведения из плазмы и оказывая влияние на транспорт лекарств или их локализацию и накопление в клетках-мишенях [11, 12]. 5'-О-Сложноэфирные пролекарства НИОТ структурно разделяют на несколько групп, среди которых можно отметить карбоксиэфирные пролекарства, 5'-монофосфатные пролекарства с маскирующими заряд группами и без них. Такие сложноэфирные производные преобразуются путем гидролиза и/или ферментативного расщепления в исходный нуклеозид или его 5'-монофосфатную форму.

В настоящее время среди различных пролекарственных стратегий выделяется концепция, подразумевающая использование веществ липидной природы. Конструируя модифицированные препараты, необходимо учитывать естественные пути метаболизма липидов внутри организма: гидролиз, абсорбцию, внутриклеточную трансформацию в энтероцитах. Отличительной

особенностью конъюгатов, использующих 1,3-диглицериды в качестве липидной составляющей, выступает сходство с природными триглицеридами, что позволяет имитировать пути метаболизма липидов, в частности лимфатический транспорт этих пролекарств [13, 14]. Для увеличения химической и метаболической стабильности липофильных конъюгатов может быть использован изостерный подход, основанный на получении амидных аналогов подобных глицеролипидных производных на основе 1,3-диаминопропан-2-ола. Дизайн новых изостеров представляет собой привлекательную концепцию лекарственной химии, использование которой может привести к улучшению характеристик лекарственных препаратов [15].

Цель работы – синтез новых липофильных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT), 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина (ЗТС) на основе 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола, в том числе получение их амидофосфатных конъюгатов с эфирами L-α-аминокислот в качестве потенциальных противовирусных агентов и исследование их анти-ВИЧ-активности и цитотоксичности. Анализ взаимосвязи ингибирующей активности соединений с их структурой может позволить осуществлять рациональную модификацию подобных пролекарств, что приведет к созданию препаратов с высокой эффективностью действия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе осуществлен синтез Н-фосфонатдиэфирных и фосфодиэфирных пролекарств AZT и ЗТС на основе 1,3-(дипальмитоил-амино)пропан-2-ола, а также их амидофосфатных

конъюгатов с эфирами L-α-аминокислот. Такие фосфорсодержащие производные могут блокировать вирусную полимеразу при внутриклеточном синтезе функционального вирусного генома. Наличие фосфорных связей между структурными фрагментами таких липофильных пролекарств приводит к высвобождению нуклеозидмонофосфата в процессе их метаболизма. Данный механизм высвобождения лекарственного средства может позволить сократить стадии фосфорилирования в макрофагах/моноцитах, одних из значительных резервуаров ВИЧ в организме человека, где наблюдается пониженная активность тимидинкиназы. Накопление конъюгатов в клетках и их последующий гидролиз с помощью клеточных ферментов (например, фосфодиэстераз) будет приводить к более медленному высвобождению нуклеозидмонофосфата и способствовать снижению рисков возникновения резистентности, а также даст возможность сократить дозы препарата за счет пролонгированного эффекта.

1,3-(Дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат (**I**) получали по методу [16]. С целью увеличения липофильности и мембранотропных свойств целевых веществ проводили синтез смешанного сукцината 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола и 1,6-гександиола (**II**) путем этерификации 1,6-гександиола (2 экв.) соединением (**I**) при активирующем действии DCC (1.2 экв.) и DMAP (1.5 экв.). Соединение (**II**) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (1% метанола), выход составил 75% (схема 1), его строение было охарактеризовано с помощью ЯМР-спектроскопии: в ¹H-ЯМР-спектре появились сигналы протонов CH₂-групп гександиола.

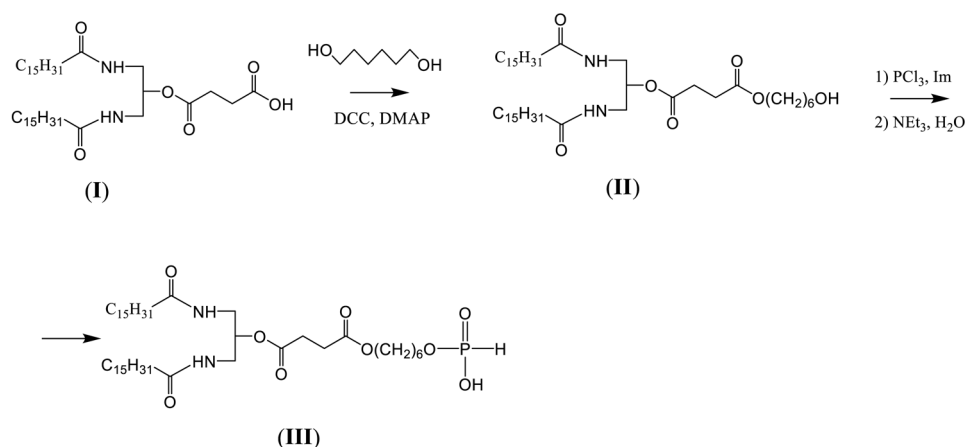


Схема 1. Получение Н-фосфонатмоноэфира (**III**).

В попытках обойти первую стадию фосфорилирования при метаболическом превращении нуклеозида (Nuc) в Nuc-TP были предложены многочисленные типы липофильных пролекарств Nuc-MP с ожиданием, что эти пролекарства будут внутриклеточно высвобождать Nuc-MP. Минуя первую стадию фосфорилирования, регулируя транспорт и обеспечивая замедленное высвобождение противовирусных нуклеозидов, такие пролекарства продлевают продолжительность их действия, снижают токсичность и улучшают переносимость у пациентов [17, 18]. С целью повышения противовирусной активности исходных нуклеозидов исследователи разработали липофильные фосфорные производные [13, 19, 20]. Маскировка фосфатной группы необходима для преодоления недостаточного проникновения через клеточную мембрану полярных (заряженных) свободных нуклеотидов. Были синтезированы различные 5'-монофосфатные пролекарства НИОТ с маскирующими заряд группами, в том числе фосфодиэфиры (производные моноалкил- и моноарилфосфатов, производные фоскарнета), фосфотриэфиры (диалкил-, диарил-, гликозил-фосфотриэфиры и стероидные фосфотриэфирные конъюгаты), амидофосфаты, производные динуклеотидфосфатов, водород- и метиленфосфонаты.

Для соединения НИОТ с липофильным вектором посредством фосфорных связей нами был выбран Н-фосфонатный метод. Фосфорилирование липофильного вектора (II) осуществляли избытком полученного *in situ* трис(имидазолил)фосфина

при -5°C в хлористом метиле. Конверсию исходного соединения до образования более полярного фосфорсодержащего продукта контролировали с использованием ТСХ-анализа. Соединение (III) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, выход составил 70%. Строение Н-фосфонатмоноэфира (III) подтверждалось данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектров. Спектр ^1H -ЯМР этого соединения содержал сигналы протонов всех функциональных групп, в том числе протона Р-Н в области спектра 6.72 м.д. с характерной константой спин-спиновой взаимодействия ($J_{\text{PH}} = 611$ Гц). Данные ^{31}P -ЯМР-спектроскопии для соединения (III) свидетельствовали об отсутствии побочных продуктов.

Синтез Н-фосфонатдиэфиров (VI) и (VII) (схема 2) осуществляли конденсацией липофильного вектора (III) с анти-ВИЧ-нуклеозидами (AZT (IV), 3ТС, (V)) (2 экв.) при активирующем действии пивалоилхлорида (3 экв.), фосфодиэфиры (VIII) и (IX) получали аналогично, с последующим окислением промежуточных Н-фосфонатдиэфиров йодом в смеси пиридин/вода [19]. Полученные соединения очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с выходом $>60\%$. Структуру подтверждали методами ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, данными масс-спектрометрии и элементного анализа. В спектрах ^{31}P -ЯМР соединения (VI) наблюдалось два синглета с интенсивностью 1 : 1.5 (δ_{P} 8.18 и 7.19 м.д.), соединения (VII) – с интенсивностью 1 : 1 (δ_{P} 7.97 и 8.74 м.д.), что свидетельствует об образовании диастерео-

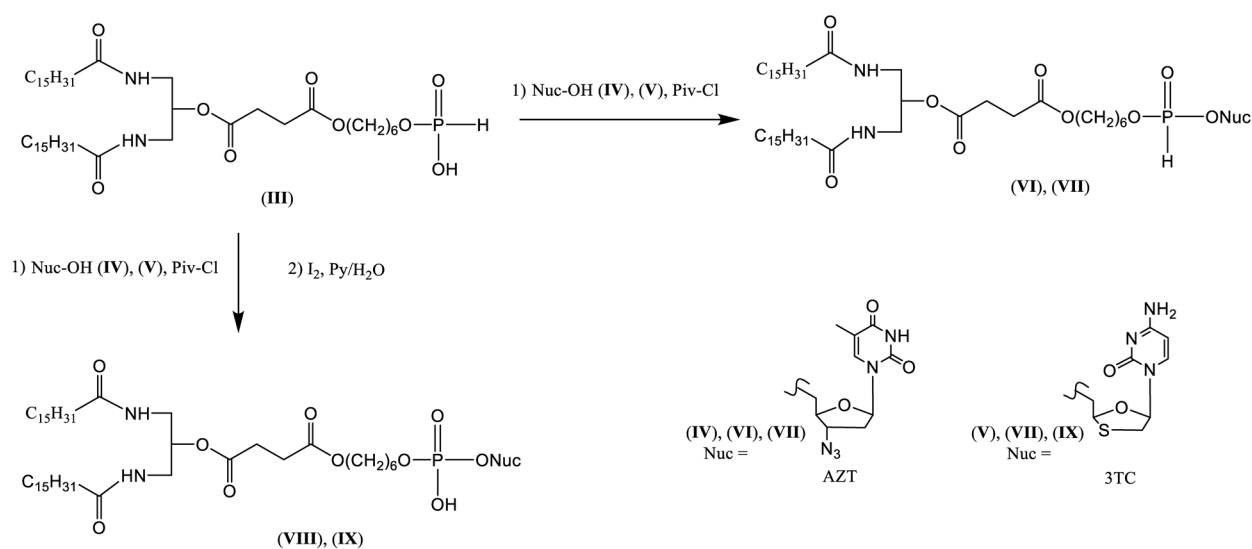


Схема 2. Конъюгирование анти-ВИЧ-нуклеозида с липофильным вектором с получением Н-фосфонатмоноэфирных (VI), (VII) и фосфодиэфирных производных (VIII), (IX).

меров по фосфору. ^{31}P -ЯМР-спектры соединений (**VI**) и (**IX**) содержали один сигнал в области химических сдвигов (δ_{P} -1.81 и -3.06 м.д., соответственно).

Ранее было показано, что амидофосфатные производные AZT представляют большой интерес, т.к. многие из них проявляют высокую противовирусную активность [20, 21]. В настоящей работе был осуществлен синтез амидофосфатных конъюгатов AZT на основе 1,3-(дипальмитоил-амино)пропан-2-ола, модифицированных по фосфорному центру остатками эфиров аминокислот. Одно из преимуществ амидофосфатов – их способность к высвобождению Nuc или Nuc-MP в процессе метаболизма.

Первый шаг в пути активации состоит в том, что карбоксиэстеразы гидролизуют эфирную группу аминокислоты, оказывающую выраженное влияние на фармакокинетику и стабильность амидофосфатного конъюгата. Природа боковой цепи аминокислоты и сахарной части играют существенную роль в образовании аминокислотного метаболита через циклический промежуточный продукт. За этим следует превращение аминокислотного метаболита в свободный AZT-монофосфат.

ProTide-подход приводит к получению смеси диастереомеров по фосфору, и в некоторых случаях возможно их разделение хроматографией или фракционной кристаллизацией. Использо-

вание стереоселективного синтеза на основе амидофосфатного предшественника с определенной конфигурацией фосфорного центра позволяет получить соответствующий диастереомер производного нуклеозида. Два диастереомера по фосфору могут иметь разные скорости метаболизма и, следовательно, различную активность. Например, Sp-диастереомер ProTide софосбувира, применяемый в клинике, проявляет 10-кратное повышение противовирусной активности по сравнению с его Rp-диастереомером [22].

Получение амидофосфатных конъюгатов (**Xa–Xd**) проводили взаимодействием H-фосфоната (**VI**) с гидрохлоридами эфиров L- α -аланина (1.2 экв.) при 0°C в смеси триэтиламин–четырёххлористый углерод–вода–ацетонитрил (1 : 1 : 1 : 10, по объему) (схема 3). Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле, структуру подтверждали данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектров, а также масс-спектрометрией. В спектре ^{31}P -ЯМР соединения (**Xa**) наблюдалось два синглета с интенсивностью 1 : 2 (δ_{P} 7.48 и 7.69 м.д.), соответствующие диастереомерам по фосфору. Соединения (**Xb–Xd**) теоретически тоже представляют собой смесь диастереомеров, но на спектрах ^{31}P -ЯМР имеется один сигнал (вероятно, наложение сигналов). В выбранных нами условиях не происходило хроматографического разделения Sp- и Rp-диастереомеров соединений (**VI**), (**VII**) и (**Xa–Xd**). Для исследования противовирусной

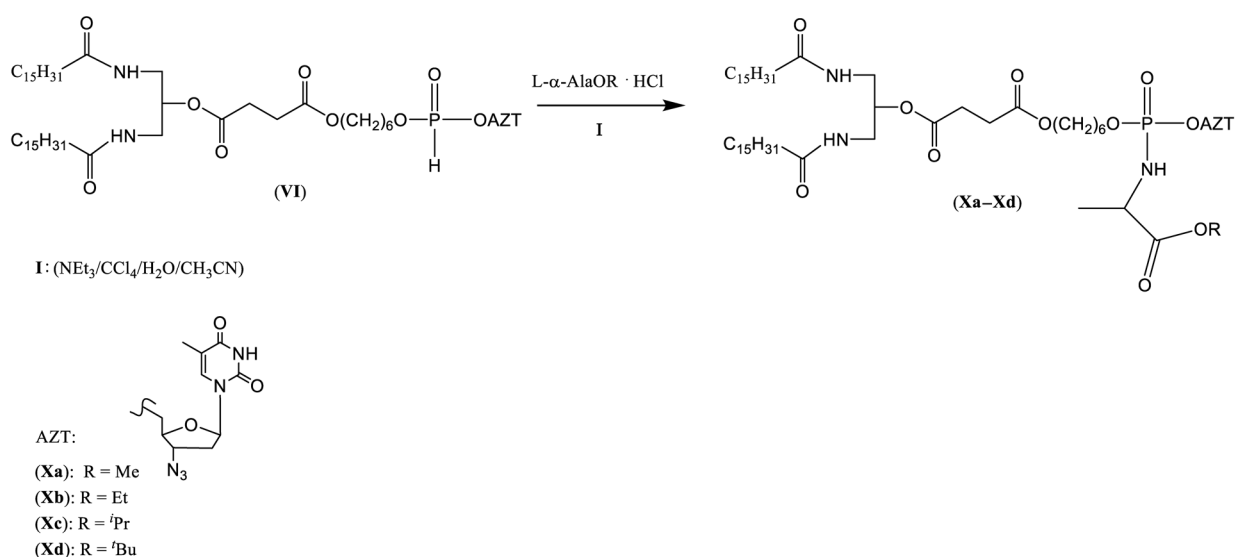


Схема 3. Синтез амидофосфатных конъюгатов (**Xa–Xd**).

активности данные соединения использовали в виде смеси диастереомеров.

Важный факт – необходимость в высвобождении фармакофора непосредственно в клетках-мишенях. Поэтому необходимой задачей работы было изучение степени подверженности химическому гидролизу полученных конъюгатов в процессе транспорта к зараженным органам и тканям.

Мы провели исследования кинетики гидролиза синтезированных соединений (конъюгаты AZT и ЗТС с Н-фосфонатдиэфирной (соединения (VI) и (VII)) и фосфодиэфирной (соединения (VIII) и (IX)) связями, а также амидофосфатных конъюгатов (Xa–Xd) в различных буферных растворах, моделирующих pH физиологических сред (крови, кишечника, лимфатической системы), по которым проходит доставка пролекарственных соединений к зараженным клеткам при пероральном введении, а также способных оказывать влияние на конструируемые связи в структуре конъюгатов. Кинетика процессов показала, что для соединений (VI) и (VII) время половинного гидролиза составило ≤ 1 ч, для соединений (VIII), (IX) и (Xa–Xd) – более 20 ч.

При исследовании анти-ВИЧ-активности и цитотоксического действия новых липофильных

производных анти-ВИЧ-нуклеозидов (AZT, ЗТС) на основе амидного изостера 1,3-дипальмитоил-глицерина, а также амидофосфатных конъюгатов AZT с эфирами L- α -аланина в качестве референс-соединений использовали AZT и ЗТС (табл. 1 и 2). Оценку противовирусного действия соединений против штаммов HIV-1 MVP-899 и HIV-1 RF в клетках MT-4 проводили с помощью МТТ-анализа. Клетки MT-4 (6×10^5 кл./мл) предварительно инкубировали с соединениями в течение 1 ч при 37°C, после чего производили инокуляцию вирусным штаммом MVP-899 и RF при 100 CCID₅₀. Противовирусные эффекты тестируемых соединений напрямую коррелировали с ингибированием вирус-индуцированного цитопатического эффекта (CPE).

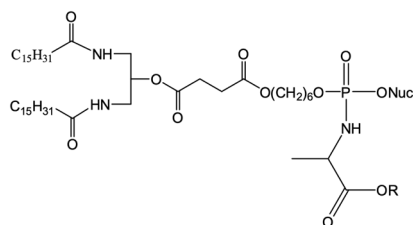
Среди Н-фосфонатдиэфирных и фосфодиэфирных конъюгатов соединения (VI) и (VIII) проявили анти-ВИЧ-активность, уступающую исходным нуклеозидам, в качестве их преимуществ можно отметить низкую цитотоксичность ($CC_{50} = > 100$ мкМ). Фосфодиэфирный конъюгат ЗТС (IX) был неактивен в данной вирус-клеточной системе.

Противовирусная активность амидофосфатов с эфирами L- α -аланина (Xa–Xd) снижалась в ряду (tBu) > Me > (iPr) > Et. Так, соединения (Xa–Xc) проявляли схожий уровень анти-ВИЧ-активности

Таблица 1. Цитотоксичность и анти-ВИЧ-активность Н-фосфонатдиэфирных (VI), (VII) и фосфодиэфирных конъюгатов (VIII), (IX)

Соединение	X	Nuc	MT-4/HIV-1 MVP-899	MT-4	SI
			EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	
(VI)	H	AZT	0.59 ± 0.02	>100	>170
(VII)	H	ЗТС	3.04 ± 0.06	>100	>40
(VIII)	ОН	AZT	1.81 ± 0.03	>100	>55
(IX)	ОН	ЗТС	>50	>50	–
AZT			0.015 ± 0.004	85 ± 25	5667
ЗТС			0.732 ± 0.020	>50	>70

Примечание: полужирным шрифтом выделены данные по наиболее активным конъюгатам.

Таблица 2. Цитотоксичность и анти-ВИЧ-активность амидофосфатных конъюгатов (**Xa–Xd**)


Соединение	R	Nuc	MT-4/HIV-1 RF	MT-4	SI
			EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	
(Xa)	Me	AZT	4.60 ± 0.02	>50	>10.8
(Xb)	Et	AZT	12.55 ± 0.38	>50	>3.9
(Xc)	ⁱ Pr	AZT	8.97 ± 0.13	>50	>5.6
(Xd)	^t Bu	AZT	0.46 ± 0.04	>50	>116.3
AZT			0.015 ± 0.040	85 ± 25	5667

Примечание: полужирным шрифтом выделены данные по наиболее активным конъюгатам.

(IC₅₀ = 4.60–12.55 мкМ), наибольшую активность проявило производное (**Xd**), содержащее остаток *трет*-бутилового эфира L-α-аланина (IC₅₀ = 0.46 мкМ). Данные соединения проявили схожую с AZT цитотоксичность (CC₅₀ > 50 мкМ). Таким образом, полученные соединения имели схожую, а в большинстве случаев меньшую цитотоксичность по сравнению с исходными препаратами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и приборы. Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц в дейтерированных растворителях. Химические сдвиги протонов приведены относительно внутреннего стандарта – тетраметилсилана (0.0 м.д.). Спектры ³¹P-ЯМР регистрировали при рабочей частоте 121.5 МГц в дейтерированных растворителях с широкополосным гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия ³¹P–{¹H}, сдвиги приведены относительно 85%-ной ортофосфорной кислоты (внешний стандарт). Элементный анализ проводили на анализаторе EA 1112 (Thermo Finnigan Italia S.p.A, Италия). Температуры плавления измеряли на приборе Stuart SMP10 (Великобритания). Масс-спектрометрию проводили на

MALDI-TOF-масс-спектрометре Bruker autoflex speed (Германия).

В работе использовали хлороформ, хлористый метилен, метанол, триэтиламин, четыреххлористый углерод, ацетонитрил, пиридин, гексан отечественного производства. Хлористый метилен и ацетонитрил перегоняли над пентоксидом фосфора, триэтиламин и пиридин очищали перегонкой над гидроксидом калия с последующей перегонкой над гидридом кальция. Хлороформ очищали перегонкой над хлористым кальцием.

В работе использовали эфиры α-L-аланина (метиловый, этиловый, изопропиловый, *трет*-бутиловый) и метиловый эфир β-аланина, 1,6-гександиол, 1,3-диаминопропан-2-ол, пальмитоилхлорид, трихлорид фосфора (Aldrich, США), DCC, янтарный ангидрид (Lancaster, Англия), DMAP, пивалоилхлорид (Merck, Германия), имидазол, сульфат натрия, гидрокарбонат натрия, йод отечественного производства. Трихлорид фосфора и пивалоилхлорид очищали перегонкой.

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil (ЗАО “Сорбполимер”, Россия) в следующих системах растворителей: (а) – хлороформ–метанол–водный аммиак (8 : 2 : 0.2); (б) – хлороформ–метанол (9.5 : 0.5); (в) – хлороформ–метанол (9.7 : 0.3).

Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли обработкой комплексом (ФМК + Ce_2SO_4), а для фосфорсодержащих соединений – окрашиванием раствором молибдата аммония в 30%-ной серной кислоте с последующим прожиганием при 200°C во всех случаях.

Колоночную хроматографию проводили на Silica gel (0.040–0.063 мм) (Merck, Германия).

Смешанный сукцинат 1,3-(дипальмитоил-амино)пропан-2-ола и 1,6-гександиола (II). Раствор 2.56 г (3.83 ммоль) 1,3-(дипальмитоиламино)-пропан-2-О-сукцината (I), 906 мг (7.68 ммоль) 1,6-гександиола, 1.18 г (5.74 ммоль) DCC и 562 мг (4.61 ммоль) DMAP в хлористом метиле (150 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, в реакционную смесь добавляли воду (80 мл), органическую фазу промывали водой (2×100 мл), высушивали над сульфатом натрия, упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (II) системой хлороформ–метанол (1% метанола).

Выход 2.21 г (75%, аморфное), R_f 0.46 (б). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (т, J 6.5, 6H, 2CH_3 , пальм), 1.22–1.76 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 2.21 (т, J 7.3, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.53–2.69 (м, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.16–3.31 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$, Нх), 3.54–3.69 (м, 4H, 2CH_2 , проп), 4.09 (м, 2H, J 6.5, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 4.75–4.91 (м, 1H, CH, проп), 6.56 (т, J 6.2, 2H, 2NH).

Н-фосфонат смешанного сукцината 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола и 1,6-гександиола (III). К раствору 2.75 г (40.4 ммоль) имидазола в хлористом метиле (100 мл) при перемешивании при температуре 0°C добавляли по каплям раствор 0.75 мл (8.65 ммоль) трихлорида фосфора в хлористом метиле (5 мл), затем через 15 мин раствор 3.20 мл (23.1 ммоль) триэтиламина в хлористом метиле (5 мл), перемешивали 15 мин, после чего при температуре –5°C прикапывали раствор 2.21 г (2.86 ммоль) соединения (II) в хлористом метиле (50 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 ч. К реакционной массе добавляли насыщенный раствор бикарбоната натрия (75 мл), водную фазу промывали хлористым метиленом (200 мл), объединенную органическую – раствором бикарбоната натрия (150 мл), сушили над сульфатом натрия, упаривали, остаток очищали колоночной

хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (III) системой хлороформ–метанол (7% метанола).

Выход 1.76 г (73%), R_f 0.36 (а), т. пл. 128–130°C (кристаллизация из хлороформа). ^1H -ЯМР-спектр (CD_3OD , δ , м.д.): 0.90 (т, J 6.7, 6H, 2CH_3 , пальм), 1.22–1.71 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 2.20 (т, J 7.4, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.53–2.69 (м, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.13–3.32 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-OR}$, Нх), 3.46 (дд, J 14.1, 4.6, 2H, CH_2 , проп), 3.83 (дд, J 14.4, 6.5, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 4.02–4.22 (м, 2H, CH_2 , проп), 4.91–5.11 (м, 1H, CH, проп), 6.72 (д, J_{PH} 611, 1H, PH), 7.27–7.48 (м, 2H, 2NH). ^{31}P -ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 4.55.

Н-фосфонатдиэфир (VI) 3'-азидо-3'-дезокситимидина и смешанного сукцината 1,3-(дипальмитоиламино)пропанола и 1,6-гександиола. К 600 мг (0.72 ммоль) Н-фосфоната (III) добавляли 386 мг (1.44 ммоль) AZT (IV) и высушивали упариванием с пиридином, растворяли в пиридине (20 мл) и при перемешивании при комнатной температуре добавляли 0.27 мл (2.17 ммоль) пивалоилхлорида, перемешивали 15 мин, к реакционной массе добавляли насыщенный раствор бикарбоната натрия (100 мл), затем хлороформ (150 мл), органическую фазу промывали водой (2×70 мл), сушили над сульфатом натрия, упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (VI) системой хлороформ–метанол (1.5% метанола).

Выход 514 мг (66%, аморфное), R_f 0.42 (в). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.88 (т, 6H, J 6.7, 2CH_3 , пальм), 1.21–1.76 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 1.94 (с, 3H, 5- CH_3 , Thy), 2.21 (т, J 7.3, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.35–2.49 (м, 2H, $2'\text{-CH}_2$), 2.56–2.72 (м, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.18–3.35 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-OR}$, Нх), 3.51–3.66 (м, 2H, CH_2 , проп), 3.97–4.20 (м, 5H, CH_2 , проп, $5'\text{-CH}_2$, $3'\text{-CH}$), 4.79–4.89 (м, 4H, CH, проп, $4'\text{-CH}$, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 6.16 (тд, J 6.4, 3.7, 1H, $1'\text{-CH}$), 6.56 (к, J 6.5, 2H, 2NH), 7.03 (д, J_{PH} 708, 1H, PH), 7.37 (с, 1H, H-6, Thy), 8.45 (с, 1H, NH, Thy). ^{31}P -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.91, 8.18 (соотношение диастереомеров 1 : 1.5). Вычислено для $\text{C}_{55}\text{H}_{98}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{P}$, %: C, 61.14; H, 9.14; N, 9.08; P, 2.87. Найдено, %: C, 60.97; H, 9.12; N, 9.05; P, 2.86.

Н-фосфонатдиэфир (VII) 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина и смешанного сукцината 1,3-(дипальмитоиламино)пропанола и 1,6-гександиола

получали аналогично соединению (VI) из 600 мг (0.72 ммоль) Н-фосфоната (III) и 331 мг (1.44 ммоль) 3ТС (V), при активирующем действии 0.27 мл (2.17 ммоль) пивалоилхлорида, соединение (VII) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (1.5% метанола).

Выход 528 мг (70%, аморфное), R_f 0.52 (б). ^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (т, J 6.7, 6H, 2CH_3 , пальм), 1.24–5.7 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 2.31 (т, J 7.5, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.63 (т, J 2.7, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.16 (дд, J 12.5, 4.0, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$, Нх), 3.45–3.69 (м, 2H, $2'\text{-CH}_2$), 4.04–4.20 (м, 6H, 2CH_2 , проп, $5'\text{-CH}_2$), 4.38–4.52 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 5.21–5.31 (м, 1H, CH, проп), 5.41 (дд J 7.6, 2.5, 1H, $4'\text{-CH}$), 6.35 (т, J 4.8, 1H, $1'\text{-CH}$), 7.05 (д, J_{PH} 708, 1H, PH), 7.50 (дд, J 7.6, 2.5, 1H, 5-CH, Cyt), 8.11 (д, J 2.1, 1H, 6-CH, Cyt). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.97, 8.74 (соотношение диастереомеров 1 : 1). Вычислено для $\text{C}_{53}\text{H}_{96}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{PS}$, %: C, 61.07; H, 9.28; N, 6.72; P, 2.97; S, 3.08. Найдено, %: C, 60.85; H, 9.24; N, 6.70; P, 2.96; S, 3.06.

1-(3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-О-фосфо)окси-6-[1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил]оксигексан (VIII). К 100 мг (0.12 ммоль) Н-фосфоната (III) добавляли 64.3 мг (0.24 ммоль) AZT (IV) и высушивали упариванием с пиридином, растворяли в пиридине (5 мл) и при перемешивании при комнатной температуре добавляли 44.4 мкл (0.36 ммоль) пивалоилхлорида, через 15 мин добавляли 61.1 мг (0.24 ммоль) йода в смеси Ру–вода (98 : 2; 1.22 мл; v/v), перемешивали 15 мин, реакционную смесь разбавляли хлороформом (50 мл), промывали 5%-ным раствором бисульфита натрия (2×30 мл, органический слой высушивали над сульфатом натрия, растворители упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (VIII) системой растворителей хлороформ–метанол (10→20% метанола).

Выход 73 мг (55%, аморфное), R_f 0.55 (а). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO-}d_6$, δ , м.д.): 0.84 (т, 6H, J 6.4, 2CH_3 , пальм), 1.17–1.56 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 1.81 (с, 3H, 5-CH_3 , Thy), 2.04 (т, J 7.2, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.21–2.32 (м, 2H, $2'\text{-CH}_2$), 2.97–3.10 (м, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.55–3.70 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$, Нх), 3.77–3.89 (м, 2H, CH_2 , проп), 3.92–4.29 (м, 5H, CH_2 , проп,

$5'\text{-CH}_2$, $3'\text{-CH}$), 4.37–4.51 (м, 3H, $4'\text{-CH}$, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 4.69–4.81 (м, 1H, CH, проп), 6.13 (т, J 6.6, 1H, $1'\text{-CH}$), 7.69 (д, J 6.0, 2H, 2NH), 7.84 (с, 1H, Н-6, Thy), 8.07 (с, 1H, NH, Thy). ^{31}P -ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$, δ , м.д.): –1.81. MS (MALDI-TOF): m/z рассчитано для $\text{C}_{55}\text{H}_{98}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{P}$ [$M + K$] $^+$: 1135.500; найдено 1135.256.

1-(2',3'-Дидезокси-3'-тиацитидин-5'-О-фосфо)-окси-6-[1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил]оксигексан (IX) получали аналогично соединению (VII) из 100 мг (0.12 ммоль) Н-фосфоната (III), 55.1 мг (0.24 ммоль) 3ТС (V) при активирующем действии 44 мкл (0.36 ммоль) пивалоилхлорида, промежуточный продукт окисляли 61 мг (0.24 ммоль) йода в смеси Ру–вода (98 : 2, 1.22 мл, v/v), соединение (IX) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (10→20% метанола).

Выход 60 мг (48%, аморфное), R_f 0.60 (а). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO-}d_6$, δ , м.д.): 0.87 (т, J 6.4, 6H, 2CH_3 , пальм), 1.25–1.66 (2м, 60H, 24CH_2 , пальм, $2\beta\text{-CH}_2$, пальм, 4CH_2 , Нх), 2.22 (т, J 7.5, 4H, $2\alpha\text{-CH}_2$, пальм), 2.58–2.65 (м, 4H, 2CH_2 , сукц), 3.17–3.35 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{-OP}$, Нх), 3.36–3.63 (м, 4H, CH_2 , проп, $2'\text{-CH}_2$), 3.83–4.44 (м, 6H, CH_2 , проп, $5'\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-O-сукц}$, Нх), 4.82–4.94 (м, 1H, CH, проп), 5.30–5.45 (м, 1H, $4'\text{-CH}$), 6.29 (с, 1H, $1'\text{-CH}$), 6.97–7.12 (м, 2H, 2NH), 7.38 (д, J 5.2, 1H, 5-CH, Cyt), 8.27 (д, J 13.3, 1H, 6-CH, Cyt). ^{31}P -ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$, δ , м.д.): –3.06. MS (MALDI-TOF): m/z рассчитано для $\text{C}_{53}\text{H}_{96}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{PS}$ [M] $^+$: 1058.410; найдено 1058.512.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил-[6-(1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил)оксигексил]-(О-метил-L-аланино)амидофосфат (Ха). К раствору 11 мг (0.078 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-аланина в смеси триэтиламин–четырёххлористый углерод–вода–ацетонитрил (1 : 1 : 1 : 10, 6.5 мл) при 0°C добавляли по каплям раствор 70 мг (0.065 ммоль) Н-фосфоната (VI) в хлористом метиле (5 мл), реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 10 мин, затем растворители упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (Ха) системой хлороформ–метанол (1% метанола).

Выход 57 мг (75%, аморфное), R_f 0.66 (б). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, J 6.7,

6H, 2CH₃, пальм), 1.20–1.78 (2м, 63H, 24CH₂, пальм, 2βCH₂, пальм, 4CH₂, Hx, CH₃, Ala), 1.93 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.21 (т, *J* 7.6, 4H, 2α-CH₂, пальм), 2.29–2.48 (м, 2H, 2'-CH₂), 2.53–2.70 (м, 4H, 2CH₂, суцц), 3.26–3.32 (м, 5H, CH₂-OP, Hx, CH₂-O-суцц, Hx, NH, Ala), 3.75 (с, 3H, O-CH₃, Ala), 3.88–4.44 (м, 8H, 2CH₂, проп, 4'-CH, 5'-CH₂, CH, Ala), 4.77–4.89 (м, 1H, CH, проп), 6.16 дт, *J* 8.7, 6.7, 1H, 1'-CH), 6.56 (с, 2H, 2NH, проп), 7.39 (дд, *J* 22.6, 1.2, 1H, H-6, Thy), 8.64 (с, 1H, NH, Thy). ³¹P-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.48, 7.69 (соотношение диастереомеров 1 : 2). MS (MALDI-TOF): *m/z* рассчитано для C₅₉H₁₀₅N₈O₁₄P [*M*]⁺: 1181.500; найдено 1181.736.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил-[6-(1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил) оксигексил]-(О-этил-L-аланино)амидофосфат (Xb) получали аналогично соединению (Xa) из 12 мг (0.078 ммоль) гидрохлорида этилового эфира L-аланина и 70 мг (0.065 ммоль) Н-фосфоната (VI). Соединение (Xb) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (1% метанола).

Выход 56 мг (72%, аморфное), *R_f* 0.60 (б). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.87 (т, *J* 6.5, 6H, 2CH₃, пальм), 1.20–1.80 (2м, 66H, 24CH₂, пальм, 2βCH₂, пальм, 4CH₂, Hx, CH₃, Ala, CH₃, OEt), 1.93 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.21 (т, *J* 7.4, 4H, 2α-CH₂, пальм), 2.29–2.48 (м, 2H, 2'-CH₂), 2.54–2.72 (м, 4H, 2CH₂, суцц), 3.22–3.65 (м, 5H, CH₂-OP, Hx, CH₂-O-суцц, Hx, NH, Ala), 3.86–4.42 (м, 11H, 2CH₂, проп, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH₂, CH₂, OEt, CH, Ala), 4.80–4.90 (м, 1H, CH, проп), 6.17 (дт, *J* 12.3, 6.3, 1H, 1'-CH), 6.60 (т, *J* 5.3, 2H, 2NH, проп), 7.37 (с, 1H, 6H, Thy), 8.68 (с, 1H, NH, Thy). ³¹P-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.57. MS (MALDI-TOF): *m/z* рассчитано для C₆₀H₁₀₇N₈O₁₄P [*M* + Na]⁺: 1218.530; найдено 1218.734.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил-[6-(1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил) оксигексил]-(О-изопропил-L-аланино)амидофосфат (Xc) получали из 13 мг (0.078 ммоль) гидрохлорида изопропилового эфира L-аланина и 70 мг (0.065 ммоль) Н-фосфоната (VI), соединение (Xc) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (1% метанола).

Выход 58 мг (74%, аморфное), *R_f* 0.78 (б). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.87 (т, *J* 6.7, 6H, 2CH₃, пальм), 1.23–1.78 (2м, 69H, 24CH₂, пальм, 2βCH₂, пальм, 4CH₂, Hx, CH₃, Ala (CH₃)₂, ⁱPr), 1.94

(с, 3H, CH₃, Thy), 2.21 (т, *J* 7.4, 4H, 2α-CH₂, пальм), 2.29–2.50 (м, 2H, 2'-CH₂), 2.54–2.72 (м, 4H, 2CH₂, суцц), 3.25–3.64 (м, 5H, CH₂-OP, Hx, CH₂-O-суцц, Hx, NH, Ala), 3.81–4.45 (м, 10H, 2CH₂, проп, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH₂, CH, Ala, CH, ⁱPr), 4.80–4.90 (м, 1H, CH, проп), 6.17 (дт, *J* 15.5, 6.6, 1H, H1'), 6.57 (т, *J* 4.9, 2H, 2NH, проп), 7.44 (д, 1H, 6H, Thy), 8.63 (с, 1H, NH, Thy). ³¹P-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.66. MS (MALDI-TOF): *m/z* рассчитано для C₆₁H₁₀₉N₈O₁₄P [*M* + Na]⁺: 1232.560; найдено 1232.505.

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-ил-[6-(1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинил) оксигексил]-(О-трет-бутил-L-аланино)амидофосфат (Xd) получали из 14 мг (0.078 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-аланина и 70 мг (0.065 ммоль) Н-фосфоната (VI), соединение (Xd) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (1% метанола).

Выход 64 мг (70%, аморфное), *R_f* 0.72 (б). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0.88 (т, *J* 6.7, 6H, 2CH₃, пальм), 1.27–1.69 (2м, 72H, 24CH₂, Pal, 2βCH₂, пальм, 4CH₂, Hx, CH₃, Ala (CH₃)₃, Bu), 1.95 (с, 3H, CH₃, Thy), 2.22 (т, *J* 7.4, 4H, 2α-CH₂, пальм), 2.32–2.47 (м, 2H, 2'-CH₂), 2.56–2.70 (м, 4H, 2CH₂, суцц), 3.27–3.62 (м, 5H, CH₂-OP, Hx, CH₂-O-суцц, Hx, NH, Ala), 3.73–3.89 (м, H, CH, Ala), 4.02–4.43 (м, 8H, 2CH₂, проп, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH₂), 4.80–4.89 (м, 1H, CH, проп), 6.19 (дд, *J* 14.3, 7.8, 1H, 1'-CH), 6.55 (т, *J* 5.4, 2H, 2NH, проп), 7.46 (с, 1H, 6H, Thy), 8.27 (с, 1H, NH, Thy). ³¹P-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.77. MS (MALDI-TOF): *m/z* рассчитано для C₆₂H₁₁₁N₈O₁₄P [*M* + Na]⁺: 1246.590; найдено 1246.626.

Химический гидролиз в буферных растворах. Водный буферный раствор (натрий-фосфатный, pH 7.3, Трис, pH 8.5; или натрий-боратный, pH 9.5) (3 мл) уравнивали при 37°C и смешивали с растворами 2.0 мг тестируемых соединений (VI–IX, Xa–Xd) в DMSO (0.2 мл), также уравниваемыми при 37°C. Ход гидролиза контролировали с помощью ТСХ с УФ-детекцией, системы (а, б), оценивая приблизительное содержание исходного соединения и продуктов гидролиза в смеси.

Противовирусная активность. Клетки и вирусы. Клетки MT-4 (NIH AIDS Reagent Program) культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS (фетальной бычьей сыворотки;

Sigma, США), 1× пенициллин-стрептомицина и 1× GlutaMAX (Gibco BRL Life Technologies, США) при 37°C и 5% CO₂. Лабораторные штаммы HIV-1 MvP-899 и HIV-1 RF (Государственная коллекция вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАН) были использованы для инфицирования клеток MT-4.

Цитотоксичность. Клетки MT-4 (T-cell Leukemia; 3 × 10⁴ клеток на лунку) смешивали в 96-луночных планшетах с различными концентрациями исследуемых соединений (разведения в диапазоне концентраций 0.0001–100 мкМ). После 5 сут инкубации при 37°C оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста. Для этого к клеткам добавляли реагент МТТ (0.5 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO. Оптическую плотность измеряли при длине волны 590 нм с использованием SPECTROstar Nano микропланшетного ридера (BMG LABTECH GmbH, Германия). Концентрацию лекарственного средства, при которой жизнеспособность клеток снижалась на 50% (CC₅₀), определяли методом нелинейного регрессионного анализа (GraphPad 6 Software Inc., США).

Анти-ВИЧ-активность. Серийные разведения (в диапазоне концентраций 0.0001–100 мкМ) соединений добавляли к клеткам MT-4 в 96-луночных планшетах. После 2-ч инкубации при 37°C клетки инфицировали штаммом HIV-1 MvP-899 или HIV-1 RF в дозе 100 TCID₅₀ (50%-ная тканевая цитопатическая инфекционная доза). Спустя 5 сут после инфицирования ВИЧ-индуцированный цитопатический эффект оценивали с помощью МТТ-теста, как описано ранее [23], 50%-ные ингибирующие концентрации для препаратов определяли с помощью регрессионного анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описан синтез новых липофильных пролекарств 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT), 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина (ЗТС) на основе 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола, в том числе их амидофосфатных конъюгатов с эфирами L-α-аминокислот.

Исследована чувствительность к химическому гидролизу производных (VI–IX) и (Xa–Xd) в модельных буферных системах, изучена их противо-

вирусная активность *in vitro*. Синтезированные в работе производные AZT и ЗТС обладают низкой токсичностью и проявляют противовирусную активность в отношении различных клинических изолятов ВИЧ-1. Хотя по эффективности действия на клеточных моделях они уступают исходным анти-ВИЧ-нуклеозидам, их цитотоксичность ниже, к преимуществам таких конъюгатов также можно отнести возможность повышения биодоступности препаратов за счет энтероцит-опосредованного лимфатического транспорта, потенциальное внутриклеточное высвобождение нуклеозидмонофосфата, что позволяет дополнительно обойти лимитирующую стадию первичного фосфорилирования нуклеозидов. Поэтому дизайн подобных пролекарств может служить основой поиска препаратов с высокой эффективностью действия.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА, получившего поддержку Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-689 от 01.09.2021 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, проведенных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – НСШ; проведение исследований – ЕСД, МНЧ, АЭС; написание статьи – ЕСД, НСШ, АЭС; анализ данных – ЕСД, МНЧ; администрирование проекта – НСШ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. UNAIDS. Global HIV and AIDS statistics – 2024 fact sheet. UNAIDS. 2024.
<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. Lakshmi N.R., Appakkudal Anand R. // J. Controlled Release. 2014. V. 192. P. 271–283.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.003>
3. Zakharova M.A., Chudinov M.V. // Fine Chem. Technol. 2024. V. 19. P. 214–231.
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-214-231>
4. Roy B., Lefebvre I., Puy J., Perigaud C. // Tetrahedron Lett. 2011. V. 52. P. 1250–1252.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.12.105>
5. Ngilirabanga J.B., Aucamp M., Samsodiene H. // J. Drug Deliv. Sci. Tec. 2021. V. 64. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102639.8ni>
6. De Clercq E. // Nat. Rev. Drug. Discov. 2007. V. 6. P. 1001–1018.
<https://doi.org/10.1038/nrd2424>
7. Gu S., Zhu Y., Wang C., Wang H., Liu G., Cao S., Huang L. // Curr. Opin. Pharmacol. 2020. V. 54. P. 166–172.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14372>
8. Li G., Wang Y., De Clercq E. // Acta. Pharm. Sinica B. 2021. P. 1–25.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.009>
9. Lambert D.M. // Eur. J. Pharm. Sci. 2000. V. 11. P. S15–S27.
[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00161-5)
10. Kuo H., Lichterfeld M. // Curr. Opin. HIV AIDS. 2018. V. 13. P. 137–142.
<https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000441>
11. Aggarwal S.K., Gogu S.R., Rangan S.R.S., Agrawal K.C. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 1506–1510.
<https://doi.org/10.1021/jm00167a034>
12. Kucera L.S., Iyer N., Leake E., Raben A., Modest E.J., Daniel L.W., Piantadosi C. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1990. V. 6. P. 491–501.
<https://doi.org/10.1089/aid.1990.6.491>
13. Hong C.I., Nechaev A., Kirisits A.J., Vig R., West C.R., Manouilov K.K., Chu C.K. // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 1771–1777.
<https://doi.org/10.1021/jm950620o>
14. Rosowsky A., Fu H., Pai N., Mellors J., Richman D.D., Hostetler K.Y. // J. Med. Chem. 1997. V. 40. P. 2482–2490.
<https://doi.org/10.1021/jm970172f>
15. Chen X., Ding L., Tao Y., Pannecouque C., De Clercq E., Zhuang C., Chen F. // Eur. J. Med. Chem. 2020. V. 202. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112549>
16. Mergen F., Lambert D.M., Poupaert J.H., Bidaine A. // Chem. Phys. Lipid. 1991. V. 59. P. 267–272.
[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(91\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0009-3084(91)90027-9)
17. Piantadosi C., Marasco C., Morris-Natschke L., Meyer K., Gumus F., Surles J., Ishad K. // J. Med. Chem. 1991. V. 34. P. 1408–1414.
<https://doi.org/10.1021/jm00108a025>
18. Wong A., Toth I. // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. P. 1123–1136.
19. Shastina N.S., Maltseva T.Yu., D'yakova L.N., Lobach O.A., Chataeva M.S., Nosik D.N., Shvetz V.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 184–193.
<https://doi.org/10.1134/S1068162013020118>
20. Xiao Q., Sun J., Ju Y., Zhao Y., Ciu Y. // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. P. 5281–5283.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01045-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01045-6)
21. Darnotuk E.S., Siniavin A.E., Shulga N.V., Karanov E.V., Shastina N.S. // Med. Chem. Res. 2021. V. 30. P. 664–671.
<https://doi.org/10.1007/s00044-020-02672-8>
22. Roy B., Navarro V., Peyrottes S. // Curr. Med. Chem. 2022. V. 30. P. 1256–1303.
<https://doi.org/10.2174/0929867329666220909122820>
23. Siniavin A., Grinkina S., Osipov A., Starkov V., Tsetlin V., Utkin Y. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1610.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031610>

New Conjugates of 3'-Azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine Based on 1,3-(Dipalmitoylamino)propan-2-ol: Synthesis and Investigation of Anti-Hiv Activity on Model Cellular Systems

E. S. Darnotuk^{*,#}, A. E. Sinyavin^{**}, M. N. Chudina^{*}, and N. S. Shastina^{*}

[#] Phone: +7 (929) 640-67-32; e-mail: Mslizirichi@yandex.ru

^{*} MIREA – Russian Technological University (ITHT named after M.V. Lomonosov),
prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

^{**} Department of Epidemiology, Federal State Budget Institution “National Research Centre for Epidemiology and Microbiology Named After Honorary Academician N. F. Gamaleya”
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Gamalei 18, Moscow, 123098 Russia

The development of prodrugs of antiviral nucleosides with isosteric derivatives of natural lipids makes it possible to increase the bioavailability of these drugs and modulate their effectiveness. In this work, new lipophilic prodrugs of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) based on 1,3-(dipalmitoylamino)propane-2-ol were synthesized by using the H-phosphonate method, as well as phosphoramidate derivatives modified by the phosphorus center with various esters of L- α -alanine. The anti-HIV activity of the synthesized compounds against various HIV strains (HIV-1 MVP-899, HIV-1 RF) and cytotoxicity against MT-4 cells have been studied. H-phosphonate ester and phosphodiester conjugates showed lower anti-HIV activity than the original nucleosides ($EC_{50} = 0.59\text{--}3.04\ \mu\text{m}$), their advantages include low cytotoxicity ($CC_{50} > 100\ \mu\text{m}$), while the phosphodiester conjugate 3TC was inactive on this cellular model of the virus. The antiviral activity of phosphoramidate derivatives with L- α -alanine esters decreased in the range ($t\text{Bu}$) > Me > ($i\text{Pr}$) > Et, EC_{50} values were 0.46, 4.60, 8.97, and 12.55 μm , respectively, and these compounds exhibited cytotoxicity similar to AZT ($CC_{50} > 50\ \mu\text{m}$). An additional advantage of such conjugates may be the possibility of targeted transport into HIV reservoirs due to enterocyte-mediated lymphatic transport, as well as the potential intracellular release of nucleoside monophosphate, which makes it possible to bypass the limiting stage of phosphorylation of nucleosides to their active triphosphate form. Therefore, the development of such prodrugs can serve as a basis for the search for drugs with high efficacy.

Keywords: anti-HIV nucleosides, prodrugs, amide isosteres, H-phosphonate method, phosphoramidates, amino acid esters