



УДК 577.113.3

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ 5-ГАЛОГЕН-2'-АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ ЦИТИДИНА И N-ГИДРОКСИЦИТИДИНА НА ПАНЕЛИ РНК-ВИРУСОВ, ВКЛЮЧАЯ SARS-CoV-2¹

© 2023 г. П. Н. Камзеева*, Е. С. Колпакова**, Е. В. Карпова**, М. О. Бородулина**, ***,
Е. В. Яковчук**, ***, В. А. Алферова*, А. А. Чистов*, Е. С. Беляев****,
Л. И. Козловская**, ***, А. В. Аралов***, #

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН
(Институт полиомиелита), Россия, 108819 Москва, поселение Московский,
поселок Института полиомиелита, домовл. 8, корп. 1

***Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет), Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, 2/4

****Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Россия, 119071 Москва, ул. Ленинский просп., 31/4

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

Коронавирусная инфекция 2019 г. (COVID-19) – новая глобальная пандемия с высокими заболеваемостью и смертностью, вызванная распространением коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). Производные N-гидроксицитидина выглядят перспективными для борьбы с COVID-19 и другими вирусными заболеваниями, в частности молниеподобный недавно был одобрен для экстренной профилактики на ранних стадиях после инфицирования SARS-CoV-2. В работе предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидозамещенных производных цитидина и N-гидроксицитидина. Синтезированные соединения протестированы на панели из шести РНК-содержащих вирусов, включая SARS-CoV-2, энтеровирусы, CHIKV и ВИЧ-1. Ряд соединений способен ингибировать размножение вирусов SARS-CoV-2 и CHIKV в микромолярном диапазоне без заметной цитотоксичности для клеток. Структуры лидерных соединений могут быть использованы в качестве отправной точки для дальнейшего дизайна противовирусных агентов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, противовирусные агенты, нуклеозидные аналоги, N-гидроксицитидин

DOI: 10.31857/S0132342323060064, EDN: PMYJGZ

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная пандемия создала угрозу для здоровья и жизни людей, а также экономики по всему миру. Коронавирусная инфекция COVID-19, впервые выявленная в конце 2019 г. в Ухане (провинция Хубэй, Китай), привела к продолжающейся пандемии 2019–2023 гг. COVID-19 вызывает

вирус SARS-CoV-2. Общие симптомы заболевания включают лихорадку, сухой кашель, потерю обоняния и одышку, а также ряд осложнений, таких как пневмония, бронхит, вирусный сепсис, диарея и острый респираторный дистресс-синдром [1, 2]. SARS-CoV-2 – седьмой коронавирус человека после 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV и

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342323060064 для авторизованных пользователей.

Сокращения: CAN – нитрат аммония-церия(IV); CC₅₀ – цитотоксическая концентрация, необходимая для снижения флуоресцентного сигнала на 50%; CCID₅₀ – разведение вируса, вызывающее ЦПЭ в 50% клеток; CHIKV – вирус Чикунгунья; COVID – коронавирусная инфекция 2019 г.; EC₅₀ – эффективная концентрация, необходимая для снижения образования признаков вирус-индуцированной гибели клеток на 50%; EV – энтеровирус; EV-A71 – энтеровирус A71; E30 – эховирус 30; FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств; PV1 – полиовирус 1-го типа; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза; SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 606-29-10; эл. почта: Varuh238@mail.ru).

SARS-CoV. Как и все коронавирусы, SARS-CoV-2 представляет собой оболочечный одноцепочечный РНК-содержащий вирус с положительной цепью длиной ~30000 оснований. Основываясь на организации генома SARS-CoV-2, четыре фермента рассматриваются в качестве привлекательных терапевтических мишеней, включая протеазы PLpro (nsp3) и 3CLpro (nsp5), РНК-зависимую РНК-полимеразу RdRp (nsp12) и РНК-хеликазу (nsp13) [3]. RdRp катализирует синтез вирусной РНК и, таким образом, играет центральную роль в цикле репликации и транскрипции вируса.

Ремдесивир, монофосфорамидатное пролекарство С-аденозинового нуклеозидного аналога GS-441524 [4], был первым ингибитором RdRp, одобренным FDA для лечения пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Однако его влияние на частоту госпитализаций и смертность незначительно [5], а неудовлетворительные фармакокинетические свойства (в настоящее время одобрен для внутривенного введения) делают монотерапию ремдесивиром неэффективным вариантом для лечения людей, инфицированных SARS-CoV-2. Молнупиравир (EIDD-2801, пролекарственная форма – 5'-изобутириловый эфир *N*-гидроксицитидина) [4] был разрешен FDA для экстренного использования при лечении COVID-19 у некоторых взрослых, но, несмотря на его значительную активность *in vitro*, он проявляет заметную токсичность в некоторых клеточных системах, включая индукцию мутагенеза в клетках млекопитающих [6]. Кроме того, применение молнупиравира имеет множество ограничений, включая запрет на использование пациентами младше 18 лет (из-за его влияния на рост костей и хрящей) и беременными женщинами (из-за потенциального вреда для плода) [7].

Предполагается, что *N*-гидроксицитидин проявляет активность по отношению к РНК-содержащим вирусам по механизму летального мутагенеза с внесением транзиции С → U [8–10], но также обладает мутационной активностью по отношению к геному клеток млекопитающих из-за восстановления рибонуклеотидредуктазой 2'-гидроксильной группы рибозного кольца до атома водорода [6]. Для предотвращения подобного восстановления и, следовательно, снижения мутагенного потенциала *N*-гидроксицитидина для реципиента мы решили синтезировать производные *N*-гидроксицитидина, содержащие вместо 2'-гидроксильной группы изостерную ей азидную группу [11, 12], и оценить их противовирусную активность. Введение азидной группы в состав нуклеозидов позволяет инактивировать, например, рибонуклеотиддифосфатредуктазу из *E. coli* [13]. С другой стороны, 5-хлор-2'-дезоксцитидин (5ClдС) обладает мутагенными свойствами *in vitro* и *in vivo* и вызывает транзицию С → Т с частотами в диапазоне 3–9%

[14]. Поскольку от рибонуклеотидного аналога 5ClдС можно ожидать транзицию С → U в РНК-контексте, аналогичную вызываемой *N*-гидроксицитидином, представляет интерес комбинация заместителей цитозина по положениям 5- (хлор и другие атомы галогена) и 4- (гидроксигруппа), которая может усилить мутагенный потенциал *N*-гидроксицитидина. С целью проверки данной гипотезы в настоящей работе предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидозамещенных производных цитидина и *N*-гидроксицитидина, проведена оценка цитотоксичности и противовирусной активности полученных соединений на панели РНК-содержащих вирусов, включая SARS-CoV-2, энтеровирусы (EV-A71, E30, PV1), CHIKV и ВИЧ-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2'-Азидо-2'-дезоксидеоксиридин (I) и 3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксидеоксиридин (II) были синтезированы по ранее описанному методу [15] (рис. 1). Галогенирование урацильного кольца по 5-му положению проводили согласно разработанным ранее методикам [16] кипячением в CH₃CN смеси соединения (II) и нитрата аммония-церия(IV) (CAN) в присутствии LiCl, LiBr или I₂ в качестве источника атома галогена, получили производные (III), (IV) и (V) соответственно. Следуя описанному ранее методу, проводили превращение соединения (II) в триазолилное производное с последующим одновременным формированием цитозинового кольца и удалением ацетильных защитных групп обработкой водным аммиаком в 1,4-диоксане, получили соединение (VI) [17]. Используя аналогичную методику, впервые были получены производные (VII), (VIII) и (IX), замещенные по 5-му положению цитозинового кольца атомом хлора, брома или иода соответственно. Соединение (X) было ранее синтезировано замещением 2,4,6-триизопропилбензолсульфонильной группы гидросиламином [18]. Мы использовали недавно предложенный оптимизированный подход, основанный на прямом замещении аминогруппы цитозинового кольца остатком гидросиламина [19]. Так, водный раствор соединения (VI) обрабатывали сульфатом гидросиламина при 70°C в течение 1.5 ч с последующим выделением продукта препаративной ВЭЖХ. Аналогично были получены новые производные (XI), (XII) и (XIII). Описанные и новые соединения были охарактеризованы ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектрами (полученные спектры представлены в дополнительных материалах).

Для синтезированных соединений (III–XIII) была проведена оценка противовирусной активности *in vitro* относительно патогенных для человека РНК-содержащих вирусов с геномом положительной полярности: энтеровирусов разных видов, коронавируса, ассоциированного с тяже-

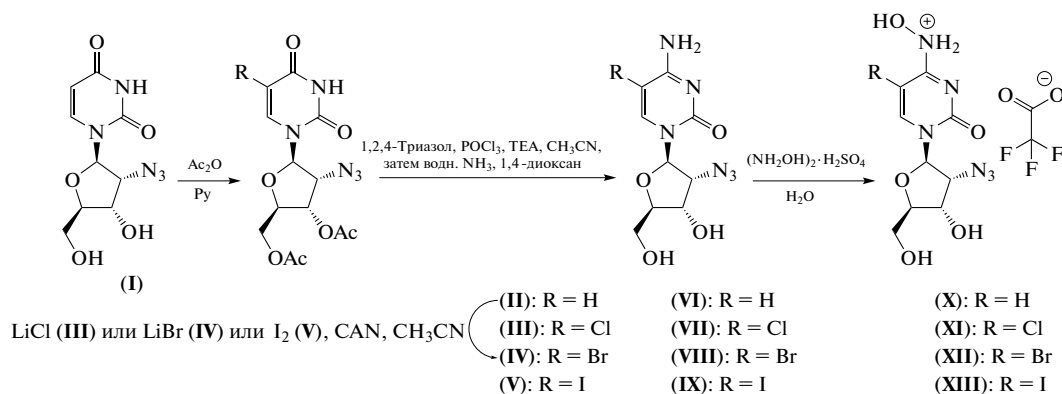


Рис. 1. Схема синтеза 5-галоген-2'-азидо-замещенных производных цитидина (VI–IX) и *N*-гидроксицитидина (X–XIII).

лым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2), вируса Чикунгунья (CHIKV) и вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) (табл. 1). Все соединения не проявляли заметной цитотоксичности на клетках Vero, RD и MT-4. Соединения не ингибировали репродукцию безоболочечных энтеровирусов и ВИЧ-1, но 5-бром-замещенное производное уридина (IV), производные (VII) и (VIII) из цитидиновой группы, а также производное (XIII) из *N*-гидроксицитидиновой группы показали активность против оболочечных вирусов SARS-CoV-2 и CHIKV в микромолярном диапазоне (85 ± 21 мкМ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реагенты получали от компаний Sigma-Aldrich (США) и Acros Organics (Бельгия) и использовали без дополнительной очистки. Безводные ацетонитрил и пиридин получали перегонкой над гидридом кальция.

ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance III 600 (Bruker, Германия; 600 и 150 МГц для ^1H - и ^{13}C -спектров соответственно) в $\text{DMSO-}d_6$ или CDCl_3 . Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия) с визуализацией пятен с помощью УФ-лампы при 254 нм. Для колоноч-

Таблица 1. Противовирусная активность и цитотоксичность синтезированных производных цитидина и *N*-гидроксицитидина

Соединение	Противовирусная активность, EC_{50} , мкМ				Цитотоксичность, CC_{50} , мкМ		
	энтеровирусы (EV-A71, E30, PV1)	SARS-CoV-2	CHIKV	ВИЧ-1	Vero	RD	MT-4
(III)	>100	>100	100	>50	>100	>100	>50
(IV)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(V)	>100	>100	100	>50	>100	>100	>50
(VI)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(VII)	>100	85 ± 21	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(VIII)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(IX)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(X)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XI)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XII)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XIII)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
Контроль	35–70*	$5.3 \pm 1.3^*$	$9.8 \pm 2.8^*$	0.0442**	>100	>100	>50

* *N*-гидроксицитидин [20].

** 3'-Азидо-3'-дезокситимидин [21, 22].

ной хроматографии применяли Silica gel 60 (0.040–0.063 мм; Merck, Германия).

Очистку соединений (X–XIII) проводили на препаративном хроматографе Puriflash 4250 (Interchim, Франция) с использованием колонки VDSpher 100 C18-E 250 × 20 мм, 10 мкм (VDC орtilab, Германия), элюенты – CH₃CN (с 0.1%-ной трифторуксусной кислотой) и 0.1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты.

Детектирование в УФ-видимой области проводили при 205 и 260 нм. Использовали линейный градиент от 5 до 60% органического растворителя в течение 15 мин, затем 95% CH₃CN в течение 4 мин при скорости потока 20 мл/мин.

Фракции, содержащие целевой продукт, собирали, растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили при высоком вакууме, получая целевой продукт в виде белого твердого остатка.

2'-Азидо-2'-дезоксигуанидин (I). Соединение (I) было получено по описанной ранее методике [15]. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., J, Гц: 11.41 (уш.с., 1H), 7.86 (д, J 8.1, 1H), 5.96 (д, J 5.5, 1H), 5.88 (д, J 5.5, 1H), 5.67 (дд, J 8.1, J 2.0, 1H), 5.18 (т, J 4.5, 1H), 4.34–4.26 (м, 1H), 4.07–4.01 (м, 1H), 3.92–3.86 (м, 1H), 3.70–3.61 (м, 1H), 3.61–3.52 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 163.0, 150.4, 140.0, 102.0, 85.5, 85.2, 70.4, 64.5, 60.1.

3',5'-Ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (II). Соединение (II) синтезировали согласно опубликованному способу [15]. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., J, Гц: 9.15 (уш.с., 1H), 7.45 (д, J 8.1, 1H), 5.88 (д, J 4.6, 1H), 5.79 (д, J 8.1, 1H), 5.23–5.17 (м, 1H), 4.38–4.31 (м, 3H), 4.28 (дд, J 5.0, J 5.6, 1H), 2.19 (с, 3H), 2.13 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 170.1, 170.0, 162.7, 149.9, 138.9, 103.1, 88.6, 79.7, 71.2, 63.8, 62.5, 20.7, 20.4.

5-Хлор-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (III). Смесь (II) (706 мг, 2.0 ммоль), LiCl (100 мг, 2.4 ммоль) и CAN (2192 мг, 4.0 ммоль) в смеси CH₃CN/AcOH (1 : 1, 60 мл) перемешивали при 80°C в течение 6 ч. После упаривания растворителя остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (40 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до грязно-белой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 71%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 9.29 (уш.с., 1H), 7.82 (с, 1H), 5.92 (д, J 3.9, 1H), 5.16 (т, J 5.7, 1H), 4.43–4.35 (м, 3H), 4.30 (дд, J 5.6, J 4.0, 1H), 2.20 (с, 6H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.0, 170.0, 158.4, 149.0, 135.5, 109.7, 88.3, 79.8, 70.5, 64.2, 61.9, 20.8, 20.3.

5-Бром-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (IV). Смесь соединения (II) (706 мг, 2.0 ммоль), LiBr (208 мг, 2.4 ммоль) и CAN (2192 мг,

4.0 ммоль) в CH₃CN (60 мл) перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Растворитель упаривали, полученный остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (40 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до желтоватой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 82%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 8.92 (уш.с., 1H), 7.90 (с, 1H), 5.92 (д, J 4.0, 1H), 5.16 (т, J 5.7, 1H), 4.43–4.36 (м, 3H), 4.28 (дд, J 5.7, J 4.0, 1H), 2.21 (с, 3H), 2.20 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.0, 169.9, 158.3, 149.1, 138.0, 97.6, 88.4, 79.9, 70.6, 64.2, 62.0, 20.9, 20.3.

5-Иод-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (V). Смесь соединения (II) (706 мг, 1.0 ммоль), иода (304 мг, 1.2 ммоль) и CAN (548 мг, 1.0 ммоль) в CH₃CN (60 мл) перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Затем растворитель упаривали, остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и 5%-ным водным раствором NaHSO₃ (50 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до желтоватой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 89%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 8.98 (уш.с., 1H), 7.93 (с, 1H), 5.92 (д, J 4.3 Гц, 1H), 5.21–5.15 (м, 1H), 4.42–4.34 (м, 3H), 4.26 (дд, J 5.7, J 4.4, 1H), 2.24 (с, 3H), 2.20 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.1, 170.0, 159.4, 149.5, 143.2, 88.2, 79.9, 70.8, 69.3, 64.1, 62.1, 21.2, 20.4.

Общий метод получения 2'-азидо-2'-дезоксигуанидиновых производных (VI–IX). К суспензии 1,2,4-триазола (621 г, 9.0 ммоль, 9.0 экв.), высушенного упариванием с сухим CH₃CN, в сухом CH₃CN (20 мл) при 0°C последовательно добавляли POCl₃ (187 мкл, 2.0 ммоль, 2.0 экв.) и триэтиламин (2100 мкл, 15 ммоль, 15 экв.), смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Затем добавляли по каплям раствор соединения (II), (III), (IV) или (V) (1.0 ммоль, 1.0 экв.) в сухом CH₃CN (10 мл). Смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 4 ч и концентрировали при пониженном давлении. Полученный оранжевый твердый остаток распределяли между CH₂Cl₂ (40 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO₃ (40 мл). Органический слой промывали водой (2 × 10 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали при пониженном давлении, получая промежуточное триазолил-замещенное производное в виде оранжевой пены. Остаток растворяли в 1,4-диоксане (20 мл), к полученному раствору добавляли 25%-ный водный раствор аммиака (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, упаривали досуха и сушили упариванием с безводным

CH₃CN. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 20% CH₃OH в CH₂Cl₂).

2'-Азидо-2'-дезоксцитидин (VI). Выход 69%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 7.87 (д, *J* 7.5, 1H), 7.50 (уш.с., 1H), 7.33 (уш.с., 1H), 5.90–5.85 (м, 2H), 5.78 (д, *J* 7.5, 1H), 5.13 (т, *J* 4.7, 1H), 4.29–4.24 (м, 1H), 3.94–3.90 (м, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.69–3.65 (м, 1H), 3.59–3.55 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 164.8, 154.0, 140.9, 94.1, 86.3, 84.6, 70.0, 65.1, 59.9.

5-Хлор-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (VII). Выход 63%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.56 (с, 1H), 8.42 (уш.с., 1H), 8.01 (уш.с., 1H), 5.75 (д, *J* 3.3, 1H), 4.31 (т, *J* 5.8, 1H), 4.11–4.05 (м, 1H), 3.92–3.86 (м, 1H), 3.75 (дд, *J* 12.2, *J* 1.9, 1H), 3.60 (дд, *J* 12.2, *J* 1.9, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 160.0, 151.2, 139.8, 99.2, 87.1, 84.4, 69.0, 65.6, 59.0.

5-Бром-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (VIII). Выход 70%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.34 (с, 1H), 7.96 (уш.с., 1H), 7.09 (уш.с., 1H), 5.89 (д, *J* 5.5, 1H), 5.78 (д, *J* 4.0, 1H), 5.33 (т, *J* 4.7, 1H), 4.33–4.25 (м, 1H), 4.04–3.99 (м, 1H), 3.90–3.84 (м, 1H), 3.77–3.68 (м, 1H), 3.62–3.53 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 161.9, 153.5, 141.5, 86.8, 86.6, 84.4, 69.3, 65.6, 59.3.

5-Иод-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (IX). Выход 59%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.35 (с, 1H), 7.88 (уш.с., 1H), 6.66 (уш.с., 1H), 5.84 (д, *J* 5.5, 1H), 5.79 (д, *J* 4.2, 1H), 5.27 (т, *J* 4.8, 1H), 4.30–4.26 (м, 1H), 4.00 (дд, *J* 4.2, *J* 5.2, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.74–3.69 (м, 1H), 3.60–3.55 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 163.7, 153.7, 146.8, 86.6, 84.3, 69.4, 65.5, 59.3, 56.9.

Общий метод получения трифторуксусных солей 4-оксим-2'-азидо-2'-дезоксцитидиновых производных (X–XIII). К суспензии цитидинового производного (VI), (VII), (VIII) или (IX) (0.5 ммоль, 1.0 экв.) в воде (250 мкл) добавляли сульфат гидроксилamina (123 мг, 0.75 ммоль, 1.5 экв.), смесь перемешивали при 70°C в течение 8 ч. Затем реакционную смесь упаривали досуха, продукт очищали препаративной ВЭЖХ.

Трифторуксусная соль 4-оксим-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (X). Выход 81%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.13 (уш.с., 1H), 9.83 (уш.с., 1H), 7.08 (д, *J* 8.2, 1H), 5.91 (д, *J* 6.9, 1H), 5.63 (д, *J* 8.2, 1H), 4.28–4.21 (м, 1H), 3.95–3.81 (м, 2H), 3.60 (дд, *J* 12.0, *J* 3.4, 1H), 3.52 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H).

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-хлор-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XI). Выход 80%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.61 (уш.с., 1H), 10.09 (уш.с., 1H), 7.50 (уш.с., 1H), 5.86 (д, *J* 6.3, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.2, *J* 4.0, 1H), 3.98 (т, *J* 5.9, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H), 3.56 (дд, *J* 12.0, *J* 3.0, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.1, 140.1, 127.7, 103.6, 85.1, 84.8, 70.6, 63.6, 60.3.

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-бром-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XII). Выход 80%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.61 (уш.с., 1H), 10.02 (уш.с., 1H), 7.57 (уш.с., 1H), 5.86 (д, *J* 6.3, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.1, *J* 4.1, 1H), 3.99 (т, *J* 5.8, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.1, 1H), 3.56 (дд, *J* 12.0, *J* 3.0, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.3, 140.3, 130.1, 91.0, 85.1, 84.8, 70.6, 63.7, 60.3.

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-иод-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XIII). Выход 69%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.57 (уш.с., 1H), 9.82 (уш.с., 1H), 7.57 (уш.с., 1H), 5.85 (д, *J* 6.4, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.3, *J* 3.9, 1H), 3.97 (т, *J* 5.9, 1H), 3.87–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H), 3.55 (дд, *J* 12.0, *J* 3.1, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.5, 141.1, 135.1, 85.1, 84.6, 70.6, 63.6, 62.3, 60.3.

Клетки и вирусы. Культура клеток почки зеленой мартышки Vero была получена от WHO Biologicals (Швейцария), культура клеток рабдомиосаркомы человека RD – из коллекции клеток NIBSC (Великобритания, ID 081003). Культуру клеток Т-клеточного лейкоза MT-4 получали в рамках программы исследований NIH AIDS (ARP-120).

Штамм ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID EPI_ISL_428852), штамм Nic CHIKV (GenBank ID MN271691-2), штамм 46973 энтеровируса A71 (EV-A71) энтеровирусов вида А (GenBank ID KJ645808), штамм 48461 эховируса 30 (E30) энтеровирусов вида В (GenBank ID MK704489) и вакцинный штамм Sabin1 полиовируса типа 1 (PV1) энтеровирусов вида С (GenBank ID AY184219) хранили в виде суспензии зараженных клеток при –70°C. Штамм NL4-3 ВИЧ-1 был получен путем трансфекции клеток MT-4 плазмидой pNL4-3 (ARP2006, NIBSC, Великобритания).

Анализ жизнеспособности клеток. Двукратные разведения стоковых растворов соединений (5 мМ в DMSO) и DMSO в качестве отрицательного контроля готовили на соответствующей среде для культивирования клеток (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведения соединений добавляли к монослоям клеток Vero и RD или суспензии клеток MT-4 в двух повторах. Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 1 : 50 для клеток Vero, RD и 1 : 100 для клеток MT-4. После инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 5 сут (клетки Vero и RD) и 10 сут (клетки MT-4) культуральную среду заменяли раствором резазурина (0.15 мг/мл; Sigma, США). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч. Затем добавляли 20 мкл 10%-ного SDS для прекращения реакции. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью прибора Fluoroskan (ThermoFisher Scientific, США) при λ_{ex} = 544 нм и λ_{em} = 590 нм. Используя кривые флуоресценции, рассчитывали CC₅₀.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (SARS-CoV-2, СНИКV). Методика была описана ранее [23]. Вкратце, восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений (5 мМ или 100 мкМ в DMSO) готовили в среде DMEM (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведенные растворы соединений, начиная с концентрации 1 : 25, смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 200–500 CCID₅₀ (50%-ных инфекционных доз). После 1 ч инкубации при 37°C смеси вируса и соединения ее добавляли к монослоям клеток Vero в двух повторах. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведениях соединений (отрицательный контроль), или *N*-гидроксицитидином [20] (положительный контроль). После инкубации в течение 5 сут при 37°C визуально оценивали цитопатический эффект по вирус-индуцированной гибели клеток, приводящей к нарушению целостности монослоя, под микроскопом Olympus CKX31 (Olympus Corporation, Япония) при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24]. Эксперимент повторяли не менее двух раз для каждого соединения. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса для обеспечения приемлемого диапазона доз.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (ВИЧ-1). Методика была описана ранее [25] с некоторыми изменениями. Вкратце, в двух повторах готовили восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений (5 мМ в DMSO) в RPMI-1640 (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведенные растворы соединений смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 200–400 CCID₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведенных растворах соединений (отрицательный контроль), или 3'-азидо-3'-дезокситимидином (положительный контроль). Затем к экспериментальным смесям добавляли суспензию клеток MT-4 (~1 × 10⁵ клеток на лунку) в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS (Invitrogen, США). Конечная серия концентраций соединений начиналась с 50 мкМ. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 10 сут инкубации (5% CO₂, 37°C) визуально оценивали цитопатический эффект под микроскопом при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24]. Все экспериментальные процедуры проводили в двух повторах и повторяли дважды.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (EV-A71, E30 и PV1). Методика была описана ранее [26]. Вкратце, восемь

двукратных разведений 5 мМ исходных растворов соединений в 2× EMEM (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия) готовили в двух повторах для получения конечной серии концентраций, начиная со 100 мкМ. Разведенные растворы соединений смешивали с равными объемами суспензии энтеровируса, содержащей 100 CCID₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведенных растворах соединений (отрицательный контроль), или *N*-гидроксицитидином (положительный контроль). После 1 ч инкубации при 36.5°C смеси соединения и вируса к ней добавляли суспензию клеток RD (~1 × 10⁵ клеток на лунку) в 2× EMEM, содержащей 5% FBS. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 5 сут инкубации при 37°C признаки цитопатического эффекта визуально оценивали под микроскопом при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидо-замещенных производных цитидина и *N*-гидроксицитидина. При скрининге на панели из шести РНК-содержащих вирусов выявлены одно производное уридина (IV), два производных цитидина (VII) и (VIII) и одно производное *N*-гидроксицитидина (XIII), обладающие способностью ингибировать репродукцию вирусов SARS-CoV-2 и СНИКV *in vitro* и не являющиеся цитотоксичными для восприимчивых к вирусам клеток.

Структуры полученных соединений могут найти применение для последующей оптимизации с целью разработки новых противовирусных препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holmes E.C., Goldstein S.A., Rasmussen A.L., Robertson D.L., Crits-Christoph A., Wertheim J.O., Anthony S.J., Barclay W.S., Boni M.F., Doherty P.C., Farrar J., Geoghegan J.L., Jiang X., Leibowitz J.L., Neil S.J.D., Skern T., Weiss S.R., Worobey M., Andersen K.G., Garry R.F., Rambaut A. // *Cell*. 2021. V. 184. P. 4848–4856.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Triggle C.R., Bansal D., Ding H., Islam M.M., Farag E.A.B.A., Hadi H.A., Sultan A.A. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 631139.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631139>
- van de Leemput J., Han Z. // *Mol. Cell. Biol.* 2021. V. 41. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00185-21>
- Khudhair Z.T., Shihab M.S., Hamah-Ameen B. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 789–804.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021040130>
- Beigel J.H., Tomaszek K.M., Dodd L.E., Mehta A.K., Zingman B.S., Kalil A.C., Hohmann E., Chu H.Y., Luetkemeyer A., Kline S., de Castilla D.L., Finberg R.W., Dierberg K., Tapson V., Hsieh L., Patterson T.F., Paredes R., Sweeney D.A., Short W.R., Touloumi G., Lye D.C., Ohmagari N., Oh M.-D., Ruiz-Palacios G.M., Benfield T., Fätkenheuer G., Kortepeter M.G., Atmar R.L., Creech C.B., Lundgren J., Babiker A.G., Pett S., Neaton J.D., Burgess T.H., Bonnett T., Green M., Makowski M., Osinusi A., Nayak S., Lane H.C. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 383. P. 1813–1826.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>
- Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., Sheahan T.P., Baric R.S., Heise M.T., Swanstrom R. // *J. Infect. Dis.* 2021. V. 224. P. 415–419.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
- Amblard F., LeCher J.C., De R., Goh S.L., Li C., Kasthuri M., Biteau N., Zhou L., Tber Z., Downs-Bowen J., Zandi K., Schinazi R.F. // *Pharmaceuticals* 2022. V. 15. P. 1144.
<https://doi.org/10.3390/ph15091144>
- Urakova N., Kuznetsova V., Crossman D.K., Sokratian A., Guthrie D.B., Kolykhalov A.A., Lockwood M.A., Natchus M.G., Crowley M.R., Painter G.R., Frolova E.I., Frolov I. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01965-17.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01965-17>
- Agostini M.L., Pruijssers A.J., Chappell J.D., Gribble J., Lu X., Andres E.L., Bluemling G.R., Lockwood M.A., Sheahan T.P., Sims A.C., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G.R., Baric R.S., Denison M.R. // *J. Virol.* 2019. V. 93. P. e01348-19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01348-19>
- Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J., Dienemann C., Kocik G., Hillen H.S., Höbartner C., Cramer P. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. P. 740–746.
<https://doi.org/10.1038/s41594-021-00651-0>
- Liu F., Chen H.-M., Armstrong Z., Withers S.G. // *ACS Cent. Sci.* 2022. V. 8. P. 656–662.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01172>
- Chen F.-F., Wang F. // *Molecules* 2009. V. 14. P. 2656–2668.
<https://doi.org/10.3390/molecules14072656>
- Wnuk S.F., Chowdhury S.M., Garcia P.I., Robins M.J. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 1816–1819.
<https://doi.org/10.1021/jo010899i>
- Fedeles B.I., Freudenthal B.D., Yau E., Singh V., Chang S., Li D., Delaney J.C., Wilson S.H., Essigmann J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 4571–4580.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507709112>
- Moffatt J.G., Verheyden J.P.H., Wagner D. // *J. Org. Chem.* 1971. V. 36. P. 250–254.
<https://doi.org/10.1021/jo00801a002>
- Asakura J., Robins M.J. // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. P. 4928–4933.
<https://doi.org/10.1021/jo00303a033>
- McGee D.P.C., Vargeese C., Zhai Y.S., Kirschenheuter G.P., Settle A., Siedem C.R., Pieken W.A. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1995. V. 14. P. 1329–1339.
<https://doi.org/10.1080/15257779508010694>
- Mieczkowski A., Wińska P., Kaczmarek M., Mroczkowska M., Garbicz D., Pilżys T., Marcinkowski M., Piwowarski J., Grzesiuk E. // *Chem. Pap.* 2018. V. 72. P. 981–990.
<https://doi.org/10.1007/s11696-017-0339-9>
- Paymode D.J., Vasudevan N., Ahmad S., Kadam A.L., Cardoso F.S.P., Burns J.M., Cook D.W., Stringham R.W., Snead D.R. // *Org. Process Res. Dev.* 2021. V. 25. P. 1822–1830.
<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00219>
- Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S., Graham R.L., Pruijssers A.J., Agostini M.L., Leist S.R., Schäfer A., Dinnon K.H., Stevens L.J., Chappell J.D., Lu X., Hughes T.M., George A.S., Hill C.S., Montgomery S.A., Brown A.J., Bluemling G.R., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Swanstrom R., Denison M.R., Baric R.S. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. P. eabb5883.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
- Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., Bolognesi D., Barry D.W., Broder S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 7096–7100.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>
- Fischl M.A., Richman D.D., Grieco M.H., Gottlieb M.S., Volberding P.A., Laskin O.L., Leedom J.M., Groopman J.E., Mildvan D., Schooley R.T., Jackson G.G., Durack D.T., King D. // *N. Engl. J. Med.* 1987. V. 317. P. 185–191.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198707233170401>
- Kozlovskaya L.I., Volog V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., Andrei G., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Aralov A.V. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 220. P. 113467.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113467>
- Kärber G. // *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1931. V. 162. P. 480–483.
- Ryazantsev D.Y., Myshkin M.Yu., Alferova V.A., Tsvetkov V.B., Shustova E.Y., Kamzeeva P.N., Kovalets P.V., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Zaitsepin T.S., Baleeva N.S., Zaitsepin T.S., Shenkarev Z.O., Baranov M.S., Kozlovskaya L.I., Aralov A.V. // *Biomolecules* 2021. V. 11. P. 1409.
<https://doi.org/10.3390/biom11101409>
- Zenchenko A.A., Oslovsky V.E., Varizhuk I.V., Karpova E.V., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Ishmukhametov A.A., Drenichev M.S. // *Toxicol. In Vitro.* 2022. V. 82. P. 105355.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105355>

Synthesis and Evaluation of the Antiviral Activity of 5-Halogen-2'-Azido-Substituted Derivatives of Cytidine and *N*-Hydroxycytidine on a Panel of RNA Viruses, Including SARS-CoV-2

P. N. Kamzeeva*, E. S. Kolpakova**, E. V. Karpova**, M. O. Borodulina**, ***,
E. V. Yakovchuk**, ***, V. A. Alferova*, A. A. Chistov*, E. S. Belyaev****,
L. I. Kozlovskaya**, ***, and A. V. Aralov***, #

#Phone: +7 (926) 606-29-10; e-mail: Baruh238@mail.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Chumakov Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), village of the Institute of Poliomyelitis, settlement Moskovskiy, 8/1, Moscow, 108819 Russia

***Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

****Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Science, Leninskiy prosp. 31, Moscow, 119071 Russia

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a new global pandemic with high morbidity and mortality caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *N*-Hydroxycytidine derivatives show promise for combating viral diseases, and in particular, molnupiravir has recently been approved for emergency prophylaxis in the early stages after infection with SARS-CoV-2. Here, a scheme for the synthesis of 5-halo-2'-azido-substituted derivatives of cytidine and *N*-hydroxycytidine is proposed. The synthesized compounds were tested on a panel of six RNA viruses, including SARS-CoV-2, enteroviruses, CHIKV, and HIV-1. A number of compounds were able to inhibit the reproduction of SARS-CoV-2 and CHIKV viruses in the micromolar range without noticeable cytotoxicity. The structures of the leader compounds can be used as a starting point for further design of antiviral agents.

Keywords: SARS-CoV-2, antiviral agents, nucleoside analogues, *N*-hydroxycytidine