

УДК 577.113.3

## НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ ГЕРПЕСА И ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИДОВ

А.Н. Коровина<sup>1</sup>, М.В. Ясько<sup>1</sup>, А.В. Иванов<sup>1,2</sup>, А.Л. Хандажинская<sup>1</sup>, Э.В. Карамов<sup>3</sup>, Г.В. Корнилаева<sup>3</sup>, М.К. Куханова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; <sup>2</sup>Centre for Medical Studies, Университет Осло; <sup>3</sup>Институт Вирусологии им. Ивановского РАМН, Москва. E-mail: lhba-imb@mail.ru

Синтезированы два новых типа производных нуклеотидов: (*Z*)- и (*E*)-9-[3-(фосфонометоксипроп-1-ен-1-ил)аденины и карбоциклический изостерный аналог гуанозина. (*Z*)- и (*E*)-изомеры подавляли репликацию ВГП и ВИЧ и были нетоксичны для клеток. Активность (*Z*)-изомера была выше по сравнению с (*E*)-изомером против обоих вирусов. Дифосфаты соединений были субстратами рекомбинантной ДНК-полимеразы ВГП и обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ. Дифосфат карбоциклического аналога гуанозина не проявлял субстратных свойств по отношению к ДНК-полимеразе ВГП, но был активен как субстрат ОТ.

В статье приняты следующие сокращения: ВГП-1 (вирус герпеса простого типа 1); ВИЧ (вирус иммунодефицита человека); ОТ ВИЧ (обратная транскриптаза); РМЕА (9-[2-(фосфонометокси)этил]аденин); РААГ (полиакриламидный гель).

### Введение

Фосфонаты нуклеозидов и их ациклические аналоги (ANPs), в которых фосфонатная группа связана с пуриновым или пиримидиновым основаниями через алифатический остаток, играют ключевую роль при создании антивирусных препаратов. Описаны несколько классов ANPs, проявляющих активность против различных вирусов [1, 2]. Специальным классом ANPs являются аналоги, содержащие ненасыщенную ациклическую цепь [3–5]. Фосфонаты нуклеозидов метаболизируются ферментами клеток до соответствующих 5'-дифосфатов, которые являются субстратами ДНК или РНК вирусных полимераз и, после встраивания в цепь вирусной ДНК или РНК терминируют их синтез [6, 7].

В данной работе синтезированы два новых типа фосфонатных производных нуклеозидов: (*Z*)- и (*E*)-9-[3-(фосфонометоксипроп)-1-ен-1-ил]аденины и карбоциклический изостерный аналог гуанозина и их дифосфаты. Изучены анти-ВИЧ и анти-ВГП свойства в культуре клеток. Дифосфаты испытаны как субстраты рекомбинантной ДНК-полимеразы ВГП и ОТ ВИЧ-1. Найдена корреляция между антивирусной активностью и субстратными свойствами соответству-

ющих дифосфатов по отношению к вирусным ферментам.

### Экспериментальная часть

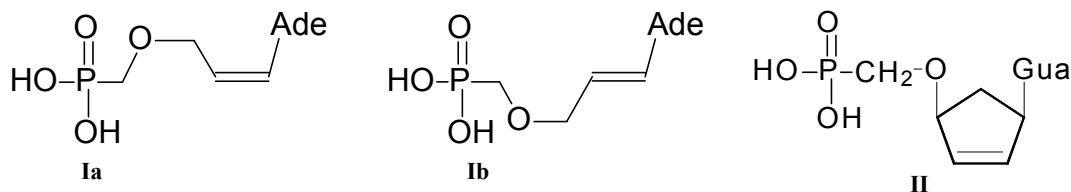
Клеточные культуры Vero and CEMss, ВИЧ-1 (EVK), ВГП-1/L2 и ацикловир резистентный штамм ВГП-1/ACV<sup>R</sup> получены из Института вирусологии им. Ивановского РАМН, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (6000 Ci/mM) – от фирмы “Изотон” (Россия). В работе использованы синтетические олигонуклеотиды производства “Litech” (Россия); ВИЧ-1 ОТ и Т4 полинуклеотидкиназа фирмы “Amersham BioSciences”; [5'-<sup>32</sup>P]-меченый праймер-матричный комплекс получен по методике [8]. Антивирусную активность и цитотоксичность соединений определяли, как описано ранее [9, 10].

ДНК-полимеразу ВГП экспрессировали в бакуловирусной системе, как описано ниже. Активности ОТ ВИЧ и ДНК-полимеразы альфа определяли по методикам [11, 12]. Синтез нуклеозидных производных и их характеристики приведены в работе [10], а соответствующие дифосфаты синтезировали по методу [13]. Соединения выделяли хроматографией на колонке с DEAE-Toyuperl и методом ВЭЖХ на колонке Lichrosorb RP-18.

**Дифосфат (*E*)-изомера:**  $\lambda_{\text{max}} = 262$  нм; <sup>1</sup>H ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.22 (1H, s, H8), 8.08 (1H, s, H2), 7.13 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub>, 14.3 Hz, H1'), 6.35 (1H, dt, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub>, 6.2 Hz, H2'), 4.23 (2H, d, H3'), 3.74 (2H, d, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>P</sub>, 8.7 Hz, PCH<sub>2</sub>), 2.99 (18H, q, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub>, 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>(Et<sub>3</sub>NH)), 1.09 (27H,

С х е м а

Структуры синтезированных соединений



Антивирусная активность соединений Ia и Ib в культуре клеток

Соединение	Анти-ВИЧ активность в клетках CEMss, мкМ		Анти-ВГП активность в клетках Vero, мкМ		
			ВГП-1/L <sub>2</sub>		ВГП-1/ACV <sup>R</sup>
	CD <sub>50</sub>	ID <sub>50</sub>	CD <sub>50</sub>	ID <sub>50</sub>	ID <sub>50</sub>
Z-isomer (Ia)	>3300	81	>3100	95	106
E-isomer (Ib)	>3300	660	>3100	387	437
РМЕА	2860	182	>344	80	77

Примечание. CD<sub>50</sub> – клеточная токсичность, ID<sub>50</sub> – активность соединений.

t, CH<sub>3</sub>(Et<sub>3</sub>NH); <sup>31</sup>P ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.59 (1P, d, <sup>2</sup>J<sub>Pα,Pβ</sub> 25.4 Hz, P<sub>α</sub>), -5.87 (1P, br.s, P<sub>γ</sub>), -21.96 (1P, br.s, P<sub>β</sub>). Дифосфат (Z)-изомера: λ<sub>макс</sub> = 261 нм; <sup>1</sup>H ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.10 + 8.07 (2H, 2s, H8+H2), 6.84 (1 H, d, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> 8.7 Hz, H1'), 5.99 (1H, dt, <sup>3</sup>J<sub>2,3'</sub>, 6.5 Hz, H2'), 4.14 (2H, dt, H3'), 3.65 (2H, d, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,P</sub> 9.0 Hz, PCH<sub>2</sub>), 3.04 (18H, q, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub>, 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>(Et<sub>3</sub>NH)), 1.12 (27H, t, CH<sub>3</sub>(Et<sub>3</sub>NH)); <sup>31</sup>P ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.50 (1P, d, <sup>2</sup>J<sub>Pα,Pβ</sub> 25.4 Hz, P<sub>α</sub>), -8.59 (1P, br.s, P<sub>γ</sub>), -22.52 (1P, br.s, P<sub>β</sub>).

Результаты

Структуры полученных соединений приведены на схеме. Антивирусная активность и токсичность соединений в культуре клеток представлены в таблице. Видно, что оба изомера **Ia** и **Ib** подавляли репликацию как ВИЧ, так и ВГП в культуре клеток, причем Z-изомер был активнее по сравнению с E-изомером и сравним по активности с контрольным соединением РМЕА; Z-изомер был также активен против ацикловир резистентного штамма HSV-1/ACV<sup>R</sup>.

Дифосфаты соединений были испытаны в односубстратных реакциях удлинения праймера, катализируемых ОТ ВИЧ и ДНК-полимеразами альфа человека и ВГП, экспрессированной в бакуловирусной системе

(рис. 1). Ген ДНК-полимеразы ВГП клонировали с помощью полимеразной реакции (ПЦР) из генома ВПГ и вставляли в плазмиду pFastBac HT В так, что на N-конце гена ДНК-полимеразы находилась последовательность, кодирующая гексагистиновый фрагмент, который позволил проводить очистку фермента с помощью аффинной колонки. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli*, содержащие бакуловирусный шаттл-вектор. После селекции отбирали клоны, содержащие ген ДНК-полимеразы, и проводили трансфекцию клеток насекомых Sf9; ДНК-полимеразу выделяли хроматографией на колонках с Ni-NTA-агарозой и гепарин-агарозой. Характеристики фермента совпадали с описанными в литературе.

На рис. 2 представлено включение дифосфатов соединений в 3'-конец праймера ДНК-полимеразами ВГП, альфой человека (а) и ОТ ВИЧ (б). Сравнение интенсивности полос, расположенных выше праймера, при одинаковой концентрации субстратов показывает, что дифосфат **Ia** более эффективный субстрат по сравнению с дифосфатом **Ib** для обоих вирусных ферментов, но не является субстратом для ДНК-полимеразы альфа человека. Полосы, находящиеся ниже праймера, в случае ДНК-полимеразы ВПГ появляются

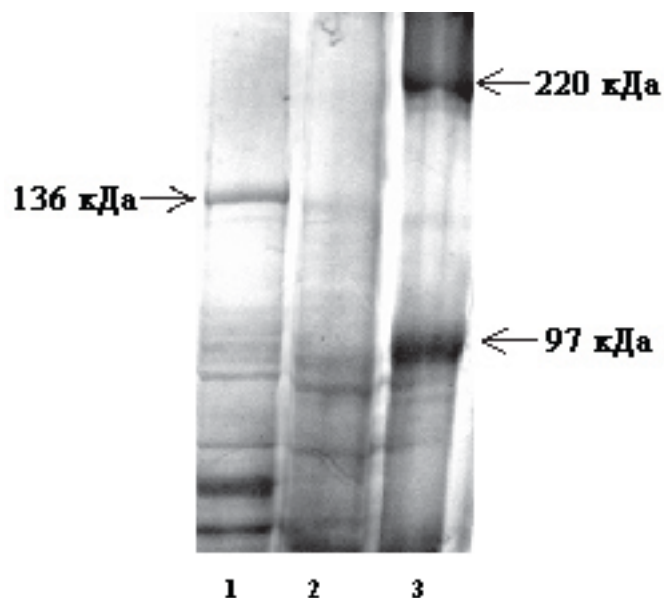


Рис. 1. Экспрессия ДНК-полимеразы ВГП-1 в бакуловирусной системе. Трек 1 – ДНК-полимераза (мол. масса 136 кДа); трек 2 – клеточный экстракт без вируса; трек 3 – свидетели

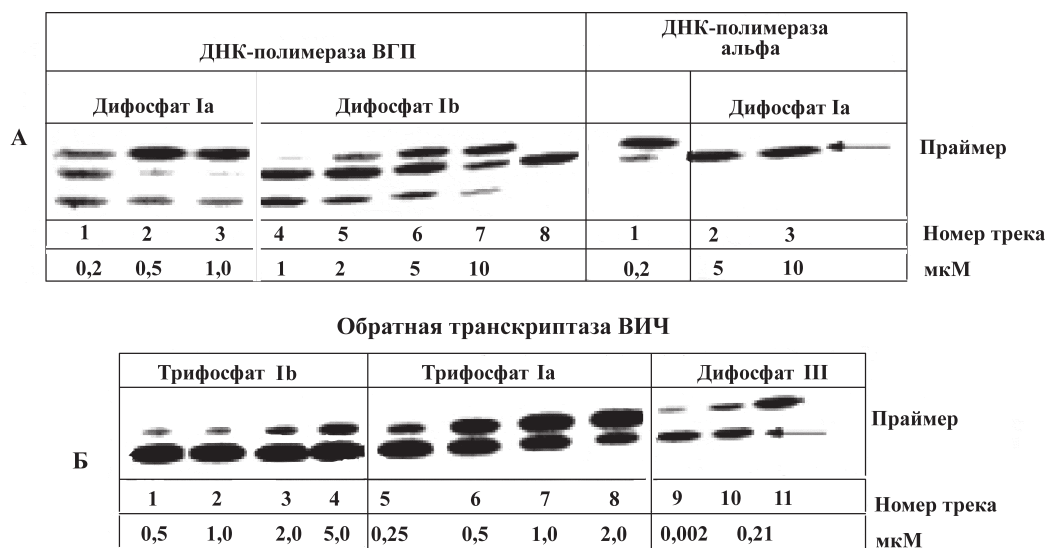


Рис. 2. Радиоавтограф ПААГ после разделения продуктов реакции включения синтезированных соединений в 3'-конец  $[5'-^{32}\text{P}]$  праймер-матричного комплекса: (А) ДНК-полимеразой ВГП (треки 1–7) и ДНК-полимеразой альфа (треки 11–13). Трек 8 показывает расположение праймера; (Б) ОТ ВИЧ. Праймер-матричный комплекс для включения дифосфатов Ia и Ib: праймер (5'-CCG TCA ATT CCT GTA GTC TCG-3'), матрица (3'-GGC AGT TAA GGA CAT CAG AGC TCG GAA-5')

ся в результате  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазной активности фермента. Дифосфат карбоциклического аналога гуанозина (III) оказался неактивным по отношению к ДНК-полимеразе ВГП (данные не приведены), но был субстратом ОТ ВИЧ (б). Селективное подавление вирусных, но не клеточных ферментов, является

необходимым условием для потенциального использования их в медицине.

### Обсуждение

Ациклические нуклеозидфосфонаты имеют широкий спектр активности против ДНК-вирусов и ретро-

вирусов [1, 2]. После попадания в клетки они подвергаются фосфорилированию клеточными киназами до соответствующих дифосфатов, которые взаимодействуют с вирусными ферментами, и после включения в цепь вирусных ДНК или РНК прекращают их синтез. Преимуществом таких соединений является их стабильность в сыворотке крови и способность подавлять вирусы независимо от нуклеозид киназы клетки. Представленный в работе (*Z*)-изомер спосо-

бен подавлять репликации как ВИЧ, так и вируса герпеса, часто сопровождающего ВИЧ-инфекцию. Следует также отметить низкую клеточную токсичность *Z*-изомера, что является необходимым условием применения лекарственных препаратов. Антивирусная активность **Ia** и **Ib** коррелирует с эффективностью включения их дифосфатов в цепь ДНК при действии вирусных ферментов и терминирует ее синтез.

Работа поддержана грантами РФФИ 06-04-48-248, 08-04-00-552, 07-04-01-141 и программой Президента для молодых ученых МК-4427.2007.4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E.* // *Intervirology*. 1997. **40**. P. 295.
2. *Holy A., Rosenberg I.* // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1987. **52**. P. 2801.
3. *Casara J., Altenburger J., Taylor D. et al.* // *Bioorgan. & Med. Chem. Lett.* 1995. **5**: P. 1275.
5. *Balzarini J., Vahlenkamp T., Egberink H. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. **41**. P. 611.
5. *Bridges C., Taylor D., Ahmed P. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. **40**. P. 1071.
6. *Xiong X., Smith J.L., Huang E.S., Chen M.S.* // *Biochem. Pharmacol.* 1996. **51**. P. 1563.
7. *Cihlar T., Chen S.* // *Mol. Pharmacol.* 1996. **50**. P. 1502.
8. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 10.
9. *Karpenko I., Jasko M., Andronova V.* // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2003. **22**. P. 319.
10. *Иванов А.В., Андропова В.Л., Галегов Г.А.* // *Биоорган. химия*. 2005. **31**. P. 65.
11. *Kukhanova M.K., Liu S.H., Mozzherin D.* // *J. Biol. Chem.* 1996. **270**. P. 23055.
12. *Hernandez T.R., Lehman I.R.* // *J. Biol. Chem.* 1990. **265**. P. 11227.
13. *Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J. P.* // *J. Med. Chem.* 1990. **33**. P. 2481.
14. *De Clercq* // *J. Clinical Virology* 2001. **22**. P. 73.

Поступила в редакцию 23.11.07

## NEW HSV AND HIV REPLICATION INHIBITORS ON THE BASE OF PHOSPHONATE NUCLEOSIDE ANALOGS

A.N. Korovina, M.V. Yasco, A.V. Ivanov, A.L. Khandzhinskaya, E.V. Karamov, G.V. Kornilayeva, M.K. Kukhanova

(*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, 119991 Moscow, Russia; University of Oslo, Centre for medical studies in Russia, Moscow, Russia; Ivanovskii Institute of Virology RAMS, Moscow; e-mail: lhba-imb@mail.ru*)

Two types of nucleoside analogs were synthesized: acyclic *Z*- and *E*-isomers of 9-[3-(phosphonomethoxy)prop-1-en-1-yl]adenine and carbocyclic isosteric analog of guanosine monophosphate. Acyclic (*Z*)- and (*E*)- isomers suppressed HSV and HIV replication and were not toxic for eukaryotic cells. The activity of (*Z*)- isomer against both viruses was higher than that of (*E*)- isomer. Diphosphates of these compounds demonstrated high substrate activity towards the recombinant HSV DNA polymerase and HIV reverse transcriptase. The diphosphatephosphonate of the carbocyclic guanosine analog didn't display notable substrate activity towards HSV DNA polymerase but acted as a substrate of HIV RT.