

Д. В. Лоншаков, Е. О. Баранова, А. И. Лютик, Н. С. Шастина, В. И. Швец

СИНТЕЗ ГЛИЦЕРОЛИПИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3'-АЗИДО-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

Одним из способов повышения биодоступности терапевтических препаратов гидрофильной природы, в частности анти-ВИЧ-активных нуклеозидов, является конструирование псевдотриглицеридных производных на их основе, которые могут использовать и имитировать метаболические пути превращений природных липидов, что дает возможность улучшить доставку препаратов в клетки-мишени. В работе выполнен синтез новых конъюгатов AZT и производных 1,3-диглицерида с использованием различных видов соединения между фармакофором и спейсерной частью гидрофобной матрицы: посредством сложноэфирных и фосфодиэфирной связей. Проведены исследования гидролитических свойств синтезированных липонуклеозидов (в буферных растворах, под действием панкреатической липазы), а также получены липосомальные препараты с включением их в фосфолипидный бислой липосом.

Ключевые слова: 3'-азидо-3'-дезокситимидин, пролекарственные соединения, липонуклеозиды, биодоступность.

Нуклеозидные анти-ВИЧ-препараты, являющиеся основой высокоактивной антитретровирусной терапии, представляют собой небольшие по размеру хиральные молекулы, имеющие определённые преимущества перед другими классами соединений. Эти лекарственные средства имитируют природные нуклеозиды и, конкурируя с ними, препятствуют работе обратной транскриптазы вируса, терминируя растущую цепь вирусной ДНК [1, 2]. Однако анти-ВИЧ-активные нуклеозиды имеют и ряд серьёзных недостатков, усложняющих их применение. Из-за своей гидрофильности и малого размера данные терапевтические агенты обладают незначительными мембранотропными, лимфотропными свойствами и ограниченной биодоступностью. Эти лекарственные соединения проявляют также высокую токсичность, ингибируя не только РНК-зависимую ДНК-полимеразу вирусов, но действуя и на здоровые клетки организма [2, 3].

Одним из путей решения этих проблем и повышения эффективности действия данного класса химиотерапевтических агентов является конструирование высоколифотропных пролекарственных производных нуклеозидных противовирусных средств, при этом лимфатический транспорт позволяет избежать первичного метаболизма этих соединений в печени, таким образом повышая их биодоступность [4, 5]. Кроме того он обеспечивает направленное воздействие таких модифицированных препаратов на вирусы, так как последние локализуются и распространяются в организме главным образом в лимфатической системе.

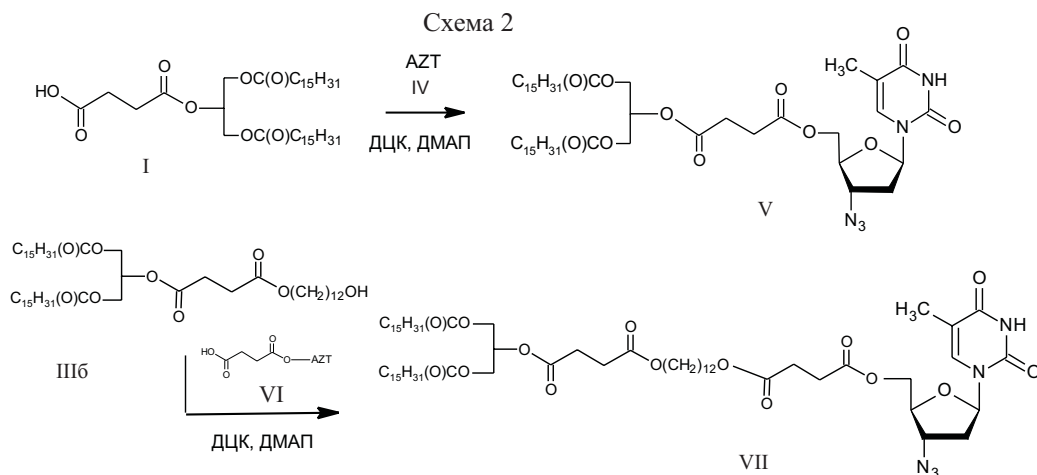
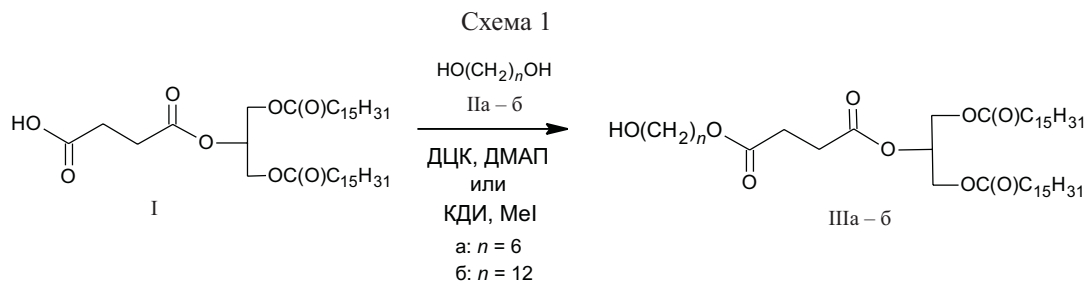
В последние годы для повышения биодоступности препаратов, в том числе и нуклеозидной структуры, широко исследуется псевдотриглицеридная стратегия, использующая 1,3-диглицериды в качестве основы для синтеза пролекарственных соединений, что приводит к получению глицеролипидных конъюгатов и позволяет придать таким производным противовирусных пре-

паратов метаболические черты природных триглицеридов [4 – 6]. Такой подход позволяет значительно улучшить биотранспортные свойства лекарственных средств за счёт увеличения их мембранотропности, а также, что обусловлено путями метаболизма соединений липидной природы в организме человека [5, 7], дает возможность нацеливания анти-ВИЧ-активных нуклеозидов на лимфатическую систему и использования преимуществ такой доставки препаратов.

В развитие данных исследований в настоящей работе на основе псевдотриглицеридного подхода нами был осуществлен синтез липофильных конъюгатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT), при этом соединение структурных фрагментов полученных глицеролипидных производных проходило с использованием сложноэфирных и фосфодиэфирных связей, являющихся биodeградируемыми в клетках-мишенях. Используемые модификации лекарственного препарата могут привести к улучшению биотранспортных свойств данного анти-ВИЧ-активного нуклеозиды, снижению его токсичности, направленной доставке терапевтического агента в лимфатическую систему, что даст возможность повысить его биодоступность. В работе также проведены исследования свойств синтезированных пролекарственных соединений и липосомальных препаратов, полученных на их основе.

Одной из ключевых задач является получение ряда соединений, липофильных векторов, на основе которых можно конструировать конъюгаты с фармакологически активными веществами, в том числе и с анти-ВИЧ-активными нуклеозидными.

Первое, что необходимо учитывать при конструировании псевдотриглицеридных пролекарственных соединений — то, что панкреатические липазы тонкого кишечника осуществляют гидролиз сложноэфирных связей в молекулах триглицеридов главным образом в положениях 1 и 3 глицеринового остова [4, 5]. Поэто-



му для того, чтобы высвобождение лекарственного средства не происходило в просвете кишечника, необходимо вводить его именно по второму положению глицеринового остова [4 – 6, 8, 9].

Кроме того, лимитирующей стадией внутриклеточной биотрансформации нуклеозидов перед тем, как они начнут выполнять свои функции (встраиваться обратной транскриптазой в цепь ДНК), является фосфорилирование. Поэтому многообещающим подходом в синтезе липонуклеозидов является получение таких конъюгатов, в которых анти-ВИЧ-активные нуклеозидные средства связаны с диглицеридными векторами через фосфодиэфирную связь, то есть получение пролекарственных соединений, в составе которых уже имеется фосфатная группа [6, 9, 10]. Такой пронуклеотидный подход может позволить уменьшить промежутки времени от момента введения пролекарственного соединения в организм до момента начала его действия, а следовательно, вводимую дозу и токсичность лекарственного средства. Таким образом, особый интерес представляет получение липофильных матриц, имеющих в структуре свободную гидроксильную функцию, которая может быть использована для образования фосфодиэфирной связи с 5'-гидроксильной группой антиретровирусных нуклеозидов.

Поэтому на первом этапе работы, исходя из сукцинильного эфира диглицерида I [8], был осуществлён синтез триглицеридных матриц IIIa – б, для чего проводили этерификацию двухатомных спиртов Па – б соединением I в присутствии в качестве конденсирующего агента N,N'-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК).

Глицеролипиды IIIa и IIIб выделяли из реакционной массы колоночной хроматографией на силикагеле, выходы составили 65,7 и 77,2 % соответственно (схема 1). Кроме того, синтез соединения IIIa был также осуществлён при активирующем действии 1,1'-карбонилдиимидозола (КДИ) и метилйодида по описанному ранее методу [11], однако этот путь синтеза триглицеридного производного IIIa оказался менее эффективным, позволив после его хроматографической очистки получить целевой продукт с выходом 36,9 %.

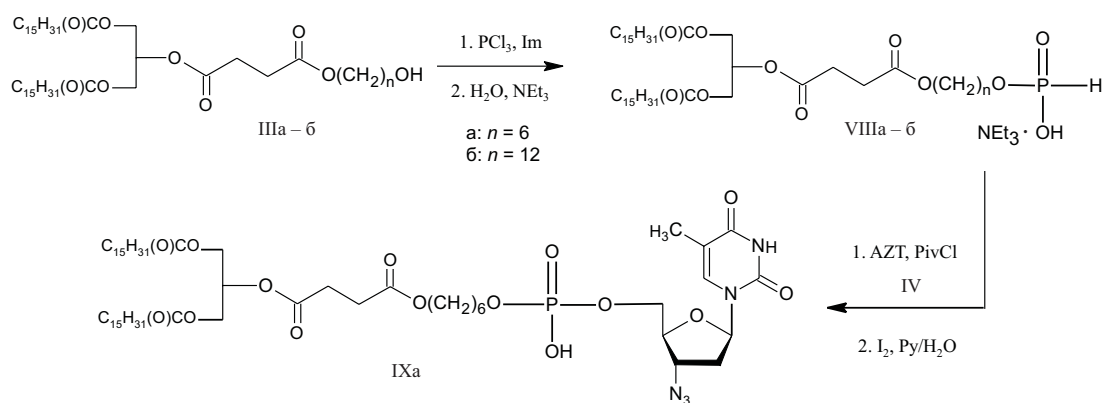
Структуры полученных соединений IIIa и IIIб были подтверждены данными спектров ^1H ЯМР, в которых наблюдались сигналы протонов остатков жирных кислот, длинноцепочечных диолов, а также глицеринового остова, а также с помощью элементного анализа.

Надо отметить, что введение в спейсер остатков длинноцепочечных спиртов ($n = 6; 12$), наряду с описанными выше преимуществами наличия свободной гидроксильной группы, позволит также улучшить мембранотропные свойства липонуклеозидов и нацелить их на лимфатический транспорт [5].

AZT может быть конъюгирован с полученными липофильными матрицами 2 основными биodeградируемыми в клетках-мишенях видами связей: через сложноэфирную связь (с карбоксильной функцией матрицы) или через фосфодиэфирную (если в составе липофильного вектора есть свободная гидроксильная группа).

Таким образом, на следующем этапе работы на основе сукцинильного эфира диглицерида I [8] было синтезировано псевдо триглицеридное пролекарствен-

Схема 3



ное соединение V, в котором AZT конъюгирован с липофильным вектором через сложноэфирную связь (схема 2); для его получения проводили этерификацию AZT IV сукцинилдиглицеридом I в присутствии ДЦК в качестве конденсирующего агента.

Аналогичный вид связывания между фармакофором и гидрофобной матрицей осуществлен в пролекарственном соединении VII, которое синтезировали с помощью этерификации соединения IIIб сукцинатом AZT VI [12] (схема 2). Псевдотриглицериды V и VII очищали колоночной хроматографией на силикагеле, в результате выходы составили 49,7 и 62,1 % соответственно. Пролекарственные соединения V и VII были охарактеризованы с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии: в спектрах присутствовали сигналы протонов всех функциональных групп данных соединений, в том числе и сигналы протонов азидотимидина.

Для получения пролекарственных соединений, в составе которых осуществляется фосфодиэфирное связывание между анти-ВИЧ-активным нуклеозидом и глицеролипидной матрицей, был выбран Н-фосфонатный метод синтеза фосфодиэфиров, в котором используются позволяющие проводить реакции с большой эффективностью высокорекреационноспособные фосфорилирующие агенты; кроме того, окисление диэфира фосфористой кислоты (промежуточного соединения) до фосфатдиэфира проводится без выделения интермедиата из реакционной смеси, что существенно упрощает синтез [13 – 17].

В соответствии с Н-фосфонатным методом проводили обработку спиртового компонента IIIб избытком полученного *in situ* трис(имидазолил)фосфина (схема 3), что не привело к значительной конверсии исходного соединения IIIб и получению Н-фосфоната VIIIб. Возможно, трудность проведения данного фосфорилирования состоит в достаточно высокой гидрофобности соединения IIIб, что в используемых условиях ведёт к экранированию гидроксильной группы и, как следствие, к низкой конверсии исходного вещества.

Использование же для этой цели вектора IIIa, имеющего в своей структуре остаток более полярного гександиола, позволило в аналогичных условиях с доста-

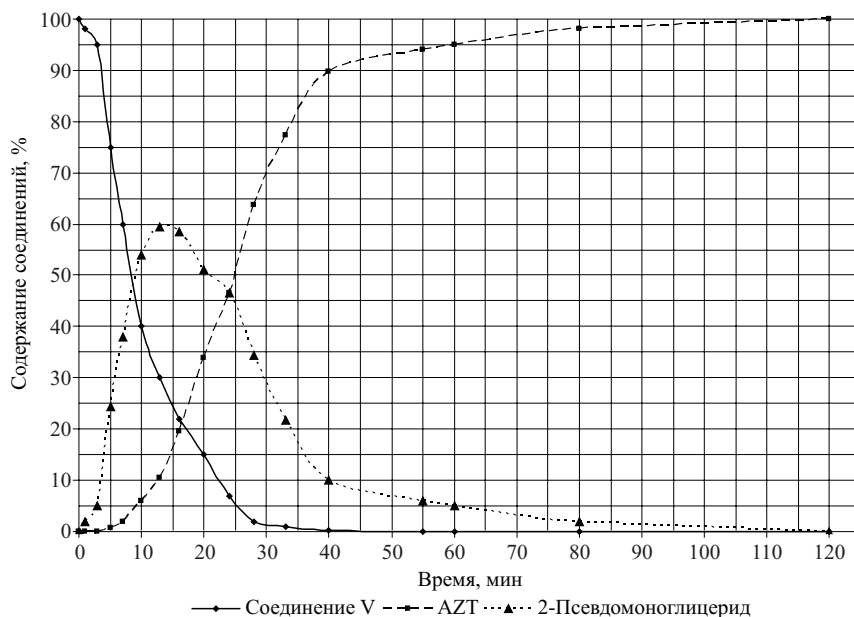
точно высокой эффективностью получить соответствующий Н-фосфонат VIIIa, который выделяли в виде триэтиламмониевой соли хроматографией на силикагеле с выходом 60,9 %. Структура соединения VIIIa подтверждалась его спектральными характеристиками. В ^1H ЯМР-спектре появился сигнал протона Р-Н связи в области 6,66 м. д. с характерной константой спин-спинового взаимодействия ($J_{\text{P, H}}$ 650,0 Гц). В ^{31}P ЯМР-спектре наблюдался сигнал в области 3,88 м.д.

В качестве активирующего реагента для конъюгирования AZT IV с Н-фосфонатом VIIIa использовали пивалоилхлорид, получающийся фосфитдиэфир окисляли до целевого фосфатдиэфира IXa раствором йода в смеси пиридина с водой. После обработки реакционной массы и очистки колоночной хроматографией на силикагеле конъюгат IXa был получен с выходом 57,2 %. Данные ^1H и ^{31}P спектроскопии AZT-содержащего соединения IXa свидетельствовали об образовании фосфодиэфирной связи между нуклеозидом и глицеролипидной матрицей. Так, ^1H ЯМР-спектр содержал необходимое соотношение сигналов нуклеозидных протонов и протонов гидрофобного фрагмента, в ^{31}P ЯМР-спектре присутствовал сигнал в области — 0,77 м.д.

В процессе транспорта пролекарственных соединений в организме человека к клеткам-мишеням эти соединения могут подвергаться действию как химического, так и ферментативного гидролиза. Поэтому при изучении свойств таких производных терапевтических средств важно исследовать, в какой степени они подвержены данным воздействиям.

Для синтезированных на основе AZT псевдотриглицеридных пролекарственных соединений V, VII, IXa, направленных на их пероральное введение в организм человека, желательнее, чтобы скорость их химического гидролиза была достаточно низкой во избежание высвобождения AZT в процессе доставки конъюгатов к клеткам-мишеням.

Поэтому в работе были проведены предварительные исследования кинетики гидролиза AZT-содержащих конъюгатов V, VII, IXa в различных буферных растворах [12, 17], моделирующих рН сред пищева-



Изменение концентрации глицеролипида V и накопления продуктов его гидролиза во времени под действием панкреатической липазы свиньи

тельного тракта, крови, лимфатической системы и др. Гидролиз осуществляли при 37 °С в водных буферных растворах: Na-фосфатном буфере, рН 7,3; ТРИС-буфере, рН 8,5; Na-боратном буфере, рН 9,5. За кинетикой процессов следили с помощью ТСХ, время полураспада соединений (табл. 1) определяли по графикам зависимостей концентраций исходных пролекарственных соединений от времени. Как видно из представленных данных, стабильность данных соединений существенно увеличивается в более нейтральных условиях (рН 7,3), в более основных условиях (рН 9,5) время полового гидролиза значительно уменьшается.

Известно, что рассматриваемые псевдотриглицеридные пролекарственные средства должны подобно их природным аналогам являться субстратами панкреатической липазы тонкого кишечника человека и подвергаться гидролизу при её действии с образованием 2-псевдомоноглицеридов, которые будут всасываться клетками эпителия кишечника, энтероцитами [4, 5].

Проводили исследования кинетики гидролиза пролекарственных соединений *in vitro* под действием панкреатической липазы свиньи [8, 18, 19], осуществляя инкубирование липонуклеозидов V, VII, IXa с данным

ферментом с активностью 375 U/мл при 37 °С в ПИП-ДЭС (1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота) буфере, рН 6,5, в присутствии в качестве кофактора фермента тауродезоксихолата натрия. Отбираемые аликвоты охлаждали до 0 °С; за кинетикой процессов следили с помощью ТСХ, контролируя как деградацию исходных соединений, так и накопление AZT и динамику превращений промежуточных продуктов гидролиза, предположительно 2-псевдомоноглицеридов. На рисунке в качестве примера приведены кривые изменения концентраций глицеролипида V и продуктов его гидролиза во времени. Время половинного гидролиза конъюгатов V, VII, IXa, а также динамику накопления продуктов гидролиза оценивали по графикам зависимостей концентраций соответствующих соединений от времени; полученные данные (табл. 1) свидетельствуют о достаточно высокой чувствительности исследуемых пролекарственных соединений к действию панкреатической липазы свиньи.

Установлено, что липонуклеозиды легко образуют липосомы и включаются в фосфолипидный бислой, и липосомы, содержащие такие модифицированные производные антивирусных нуклеозидов, поглощаются в больших количествах макрофагами *in vivo* [20]. Именно это свойство делает соединения данного класса многообещающими объектами, способными доставлять лекарственные формы в макрофаги — “хранилища” ВИЧ-инфекции, и, таким образом, уменьшать токсичность антивирусных нуклеозидов в отношении других клеток [21 – 23].

Для разработки таких форм доставки терапевтических агентов на основе синтезированных пролекарственных соединений V, VII, IXa нами были получены липосомальные препараты. Сначала диспергированием липидной плёнки в воде получали мультламеллярные везикулы (МЛВ), дисперсию которых подвер-

Таблица 1
Кинетические данные химического и ферментативного гидролиза синтезированных липонуклеозидов

Пролекарственное соединение	Химический гидролиз $t_{1/2}$, ч			Ферментативный гидролиз $t_{1/2}$, мин
	рН 9,5	рН 8,5	рН 7,3	
V	14,2	18,0	> 26,0	8,5
VII	15,0	20,0	> 28,0	17,0
IXa	7,5	18,0	> 22,0	2,5

гали озвучиванию на ультразвуковой бане с последующим многократным продавливанием через поликарбонатные ядерные фильтры липосомального экструдера, одноламеллярные везикулы (ОЛВ) получали в виде прозрачного слегка опалесцирующего раствора.

Для определения среднего диаметра полученных однослойных липосом использовали метод турбидиметрии, снимая спектр мутности полученных дисперсий в интервале 500 – 750 нм. Кроме того, размеры и морфологию частиц полученных дисперсий оценивали по их микрофотографиям. Состав липосом и размеры полученных везикул приведены в табл. 2.

Таким образом, в работе осуществлён синтез новых AZT-содержащих псевдотриглицеридных пролекарственных соединений, исследованы их гидролитические свойства, а также получены липосомальные препараты на основе этих конъюгатов. Более полное изучение медико-биологических свойств данных липофильных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина может позволить получить препараты с новыми улучшенными свойствами.

Экспериментальная химическая часть

ЯМР-спектры измеряли на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 (Германия). ^1H ЯМР-спектры (δ , м.д.) регистрировали при рабочей частоте 300 МГц в дейтерированных растворителях с гексаметилдисилоксаном в качестве внутреннего стандарта. Спектры ^{31}P ЯМР — при рабочей частоте 121,5 МГц в дейтерированных растворителях с широкополосным гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$; сдвиги приведены относительно 85 % ортофосфорной кислоты (внешний стандарт).

Температуры плавления измеряли на приборе Voetius (Германия). Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе FLASH 1112 CHNS Analyzer (Италия). Данные элементного анализа удовлетворительно подтверждали структуры синтезированных соединений.

Для получения липосом методом экструзии использовали разборный металлический блок LiposoFast Avestin (Канада), в котором закрепляли поликарбонатный ядерный фильтр Тензор (Россия) и 2 микрошприца на 1 мл Hamilton (Швейцария).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (0,040 – 0,060 мм) (Merck, Германия).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil (ЗАО Сорбполимер, Россия) в системах растворителей хлороформ — метанол (99:1) (а), хлороформ — метанол (98:2) (б), хлороформ — метанол — 25 % водный аммиак (8:2:0,2) (в), хлороформ — метанол (17:3) (г); обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли наблюдением в УФ-свете, обработкой 10 % раствором серной кислоты в метаноле с последующим прожиганием при 150 °С, а для фосфорсодержащих соединений — окрашиванием раствором молибдата аммония в

30 % серной кислоте с последующим прожиганием при 150 °С.

Хлористый метилен перегоняли над пентоксидом фосфора, этилацетат — над карбонатом калия, хлороформ — над хлоридом кальция, пиридин и триэтиламин осушали перегонкой над гидроксидом калия, а затем — над гидридом кальция, трихлорид фосфора и пивалоилхлорид очищали простой перегонкой, имидазол кристаллизовали из сухого толуола.

В работе использовали следующие реагенты: янтарный ангидрид, ДЦК (Lancaster, Англия), 4-диметиламинопиридин (ДМАП), пивалоилхлорид (Merck, Германия), пальмитоилхлорид, димер 1,3-дигидроксиацетона, 1,12-додекандиол, 1,6-гександиол, КДИ, тауродезоксихолат натрия, ПИПДЭС (Aldrich, Германия), метилйодид (Acros Organics, США), соевый фосфатидилхолин (Lipoid S100, Германия), холестерин (Sigma, США), панкреатическую липазу свиньи (ЕС 3.1.1.3), 30,1 U/мг (Fluka, США), а также, реактивы отечественного производства — имидазол, боргидрид натрия, трихлорид фосфора, сульфат натрия, гидрокарбонат натрия, бисульфит натрия, 25 % водный аммиак, йод, 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT, IV) “Ассоциации AZT” (Москва). Сукцинильный эфир 1,3-диглицерида I и 4-диметиламинопиридиниевая соль сукцинильного эфира AZT VI были синтезированы по описанным методам [8] и [12] соответственно.

Смешанный сукцинат 1,3-дипальмитоилглицерина и 1,6-гександиола (IIIa).

А. Раствор 426 мг (0,64 ммоль) 1,3-дипальмитил-2-О-сукцинилглицерина (I), 150 мг (1,27 ммоль) 1,6-гександиола (IIa), 93 мг (0,76 ммоль) ДМАП и 197 мг (0,96 ммоль) ДЦК в хлористом метиле

Таблица 2
Состав и размеры липосом, полученных на основе AZT-содержащих пролекарственных соединений

Пролекарственное соединение	Состав липосом	Диаметр липосом, нм (метод турбидиметрии)	Диаметр липосом, нм (по данным микрофотографий)
V	$\frac{\text{Фосфатидилхолин}}{\text{Соединение V}} = \frac{8}{1}$ (по массе)	235	~ 240
	$\frac{\text{Фосфатидилхолин}}{\text{Соединение V}} = \frac{5}{1}$ (по массе)	202	~ 190
VII	$\frac{\text{Фосфатидилхолин}}{\text{Соединение VII}} = \frac{9}{1}$ (по массе)	168	~ 160
	$\frac{\text{Фосфатидилхолин}}{\text{Соединение VII}} = \frac{7}{1}$ (по массе)	235	~ 220
IXa	$\frac{\text{Липиды}}{\text{Соединение IXa}} = \frac{20}{1}$ (по массе)	437	...
	$\frac{\text{Липиды}}{\text{Фосфатидилхолин}} = \frac{7}{3}$ Холестерин (моль)		

(20 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, в реакционную смесь добавляли воду (12 мл) и перемешивали ещё в течение 15 мин, органическую фазу промывали водой (2 × 10 мл), высушивали над сульфатом натрия, растворители удаляли, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя соединение IIIa смесью гексан — этилацетат (20 → 30 % этилацетата).

Выход 322 мг (65,7 %), R_f 0,59 (а), т. пл. 49 – 51 °С (кристаллизация из хлороформа). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 0,81 – 0,90 (т, 6H, 2 CH_3 , Pal), 1,16 – 1,34 (м, 48H, 24 CH_2 , Pal), 1,35 – 1,44 (м, 2H, CH_2 -диола), 1,50 – 1,69 (м, 10H, 2 β - CH_2 , Pal; 3 CH_2 -диола), 2,26 – 2,34 (т, 4H, 2 α - CH_2 , Pal), 2,58 – 2,67 (т, 4H, 2 CH_2 , succ), 3,59 – 3,65 (м, 2H, CH_2 -OH), 4,02 – 4,09 (т, 2H, O- CH_2 -диола), 4,10 – 4,31 (м, 4H, 2 CH_2 , глиц), 5,21 – 5,29 (м, 1H, CH, глиц).

Б. К раствору 130 мг (0,19 ммоль) соединения I в хлористом метиле (15 мл) добавляли 34 мг (0,21 ммоль) КДИ и 50 мкл (0,81 ммоль) йодистого метила и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, добавляли 38 мг (0,32 ммоль) 1,6-гександиола (IIa), реакционную массу кипятили в течение 10 ч, промывали насыщенным раствором соды (2 × 10 мл), водой (2 × 10 мл), органическую фазу высушивали над сульфатом натрия, растворители упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией, элюируя соединение IIIa смесью растворителей гексан-этилацетат (10 → 20 % этилацетата). Выход 46 мг (36,9 %).

Смешанный сукцинат 1,3-дипальмитоилглицерина и 1,12-додекандиола (IIIб). Глицеролипид IIIб получали аналогично соединению IIIa (метод А) из 40 мг (0,06 ммоль) 1,3-дипальмитоил-2-О-сукцинилглицерина (I), 24 мг (0,12 ммоль) 1,12-додекандиола (IIб), 8,5 мг (0,07 ммоль) ДМАП и 18 мг (0,09 ммоль) ДЦК, целевой продукт IIIб выделяли из реакционной смеси хроматографией на силикагеле, элюируя смесью гексан — этилацетат (20 % этилацетата). Выход 39 мг (77,2 %), R_f 0,45 (а), т. пл. 56 – 58 °С (кристаллизация из хлороформа). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 0,79 – 0,91 (т, 6H, 2 CH_3 , Pal), 1,13 – 1,37 (м, 60H, 24 CH_2 , Pal; 6 CH_2 -диола), 1,50 – 1,71 (м, 12H, 2 β - CH_2 , Pal; 4 CH_2 -диола), 2,23 – 2,36 (т, 4H, 2 α - CH_2 , Pal), 2,56 – 2,71 (т, 4H, 2 CH_2 , succ), 3,57 – 3,66 (м, 2H, CH_2 -OH), 4,01 – 4,32 (м, 6H, 2 CH_2 , глиц; O- CH_2 -диола), 5,19 – 5,30 (м, 1H, CH, глиц).

Смешанный сукцинат 1,3-дипальмитоилглицерина и 3'-азидо-3'-дезокситимидина (V). AZT-содержащее соединение V синтезировали аналогично глицеролипиду IIIa (метод А), из 45 мг (0,07 ммоль) 1,3-дипальмитоил-2-О-сукцинилглицерина (I), 18 мг (0,07 ммоль) 3'-азидо-3'-дезокситимидина (IV), 9,8 мг (0,08 ммоль) ДМАП и 21 мг (0,10 ммоль) ДЦК, реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, целевой продукт V очищали хроматографией на силикагеле, элюируя хлороформом. Выход 30 мг (49,7 %), R_f 0,78 (б), т. пл. 45 – 47 °С (кристаллизация из хлороформа). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 0,79 – 0,93 (т, 6H, 2 CH_3 , Pal),

1,18 – 1,39 (м, 48H, 24 CH_2 , Pal), 1,51 – 1,65 (м, 4H, 2 β - CH_2 , Pal), 1,88 – 1,96 (с, 3H, CH_3 , Thy), 2,27 – 2,35 (т, 4H, 2 α - CH_2 , Pal), 2,37 – 2,49 (м, 2H, 2'- CH_2), 2,59 – 2,72 (т, 4H, 2 CH_2 , succ), 4,01 – 4,34 (м, 7H, 2 CH_2 , глиц, 3'-CH, 5'- CH_2), 4,42 – 4,49 (м, 1H, 4'-CH), 5,18 – 5,27 (м, 1H, CH, глиц), 6,07 – 6,14 (т, 1H, 1'-CH), 7,21 – 7,28 (с, 1H, H-6, Thy), 8,21 – 8,32 (с, 1H, NH, Thy).

1-(3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-О-сукцинил)-окси-12-(1,3-дипальмитоилглицеро-2-О-сукцинил)-оксидодекан (VII). Псевдотриглицерид VII синтезировали аналогично соединению V из 40 мг (0,05 ммоль) глицеролипидного производного IIIб, 35 мг (0,07 ммоль) 4-диметиламинопиридиниевой соли сукцинильного эфира AZT VI, 6,8 мг (0,06 ммоль) ДМАП и 14 мг (0,07 ммоль) ДЦК, для выделения соединения VII из реакционной массы её хроматографировали на силикагеле, элюируя хлороформом. Выход 35 мг (62,1 %), R_f 0,61 (б), т. пл. 53 – 55 °С (кристаллизация из хлороформа). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 0,77 – 0,94 (т, 6H, 2 CH_3 , Pal), 1,11 – 1,37 (м, 60H, 24 CH_2 , Pal; 6 CH_2 -диола), 1,50 – 1,72 (м, 12H, 2 β - CH_2 , Pal; 4 CH_2 -диола), 1,89 – 1,91 (с, 3H, CH_3 , Thy), 2,23 – 2,31 (т, 4H, 2 α - CH_2 , Pal), 2,34 – 2,48 (м, 2H, 2'- CH_2), 2,55 – 2,72 (м, 8H, 4 CH_2 , succ), 3,98 – 4,32 (м, 11H, 2 CH_2 -глиц, 2 CH_2 -О-диола, 3'-CH, 5'- CH_2), 4,44 – 4,52 (м, 1H, 4'-CH), 5,19 – 5,30 (м, 1H, CH-глиц), 6,08 – 6,17 (т, 1H, 1'-CH), 7,23 – 7,28 (с, 1H, H-6, Thy), 8,27 – 8,36 (с, 1H, NH, Thy).

Н-фосфонат смешанного сукцината 1,3-дипальмитоилглицерина и 1,6-гександиола, триэтиламмониевая соль (VIIIa). К раствору 157 мг (2,30 ммоль) имидазола в хлористом метиле (8 мл) при 0 °С при перемешивании по каплям добавляли раствор 43 мкл (0,49 ммоль) трихлорида фосфора в хлористом метиле (3 мл), затем 183 мкл (1,3 ммоль) триэтиламина в хлористом метиле (3 мл), смесь перемешивали в течение 15 мин, охлаждали до – 5 °С и прикапывали раствор 127 мг (0,16 ммоль) смешанного сукцината 1,3-дипальмитоилглицерина и 1,6-гександиола (IIIa) в хлористом метиле (4 мл), реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, добавляли насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (10 мл) и перемешивали 15 мин, органический слой промывали водой (2 × 10 мл), высушивали над сульфатом натрия, растворители упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя соединение VIIIa смесью хлороформ — метанол (15 % метанола). Выход 83 мг (60,9 %), R_f 0,49 (в), т. пл. 79 – 81 °С (кристаллизация из хлороформа, размягчение при 66 – 69 °С). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 0,79 – 0,91 (т, 6H, 2 CH_3 , Pal), 1,12 – 1,33 (м, 48H, 24 CH_2 , Pal), 1,34 – 1,44 (м, 11H, CH_2 -диола; $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,47 – 1,68 (м, 10H, 2 β - CH_2 , Pal; 3 CH_2 -диола), 2,22 – 2,35 (т, 4H, 2 α - CH_2 , Pal), 2,53 – 2,66 (т, 4H, 2 CH_2 , succ), 3,01 – 3,12 (кв, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3,72 – 3,86 (м, 2H, CH_2 -OP), 3,97 – 4,07 (т, 2H, O- CH_2 -диола), 4,09 – 4,31 (м, 4H, 2 CH_2 , глиц),

5,17 – 5,27 (м, 1Н, СН, глиц), 6,66 (д, J_{р,н} 650 Гц, 1Н, РН). ³¹Р-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ, м.д.: 3,88.

Н-фосфонат смешанного сукцината 1,3-дипальмитоилглицерина и 1,12-додекандиола, триэтиламмониевая соль (VIIIб). Получение Н-фосфоната VIIIб осуществляли аналогично соединению VIIIа из триглицеридного производного IIIб, однако ТСХ-анализ (система в) продемонстрировал отсутствие конверсии соединения IIIб.

1-(3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-О-фосфо)окси-6-(1,3-дипальмитоилглицеро-2-О-сукцинил)оксигексан (IXа). 70 мг (0,08 ммоль) Триэтиламмониевой соли Н-фосфоната VIIIа и 45 мг (0,17 ммоль) AZT IV высушивали упариванием с Ру (3 мл), растворяли в Ру (5 мл) и при перемешивании при комнатной температуре добавляли 31 мкл (0,25 ммоль) пивалоилхлорида, через 20 мин добавляли раствор 43 мг (0,17 ммоль) йода в смеси Ру-вода (v/v 98:2; 0,9 мл), перемешивали 15 мин, разбавляли хлороформом (5 мл), промывали 5 % раствором бисульфита натрия (2 × 5 мл), органический слой высушивали над сульфатом натрия, растворители упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя соединение IXа системой растворителей хлороформ — метанол (10 % метанола). Выход 53 мг (57,2 %), R_f 0,59 (в), т. пл. 103 – 107 °С (кристаллизация из хлороформа, размягчение при 62 – 63 °С). ¹Н ЯМР-спектр (DMCO-d₆), δ, м.д.: 0,81 – 0,93 (т, 6Н, 2 СН₃, Pal), 1,17 – 1,29 (м, 48Н, 24 СН₂, Pal), 1,30 – 1,38 (м, 4Н, 2СН₂-диола), 1,46 – 1,62 (м, 8Н, 2β-СН₂, Pal; 2 СН₂-диола), 1,77 – 1,83 (с, 3Н, СН₃, Thy), 2,26 – 2,32 (т, 4Н, 2α-СН₂, Pal), 2,34 – 2,48 (м, 2Н, 2'-СН₂), 2,49 – 2,59 (т, 4Н, 2СН₂, succ), 3,80 – 3,91 (м, 2Н, СН₂-ОР), 3,97 – 4,03 (т, 2Н, О-СН₂-диола), 4,04 – 4,28 (м, 7Н, 2 СН₂, глиц; 3'-СН; 5'-СН₂), 4,41 – 4,49 (м, 1Н, 4'-СН), 5,15 – 5,22 (м, 1Н, СН, глиц), 6,11 – 6,18 (т, 1Н, 1'-СН), 7,53 – 7,60 (с, 1Н, Н-6, Thy), 8,52 – 8,62 с (1Н, NH, Thy). ³¹Р ЯМР-спектр (DMCO-d₆), δ, м.д.: – 0,77.

Химический гидролиз в буферных растворах и определение кинетических данных. Водный буфер (Na-фосфатный, рН 7,3, ТРИС-, рН 8.5 или Na-боратный буфер, рН 9,5) (3 мл) уравнивали при 37 °С и смешивали с раствором 1,00 мг исследуемых пролекарственных соединений V, VII, IXа в ДМСО (0,2 мл), также уравнивали при 37 °С. Процесс контролировали по ТСХ с помощью УФ-детекции (система б — для соединений V и VII, система в — для соединения IXа), наблюдая деградацию исходных липофильных производных нуклеозидов. Приблизительное содержание исходных соединений в гидролизуемых смесях оценивали по данным ТСХ-контроля и строили кривые зависимостей их концентраций от времени гидролиза, по которым определяли время половинного гидролиза конъюгатов.

Ферментативный гидролиз под действием панкреатической липазы свиньи и определение кинетических данных. 0,5 мл дисперсии липонуклеозидов V, VII, IXа (смесь 0,1 мл 25 мМ раствора исследуемого вещества в этаноле и 0,4 мл 25 мМ раствора тауроде-

зоксихолата натрия в воде) уравнивали при 37 °С и смешивали с 2,0 мл инкубационной смеси (31,1 мг панкреатической липазы свиньи (ЕС 3.1.1.3) с активностью 30,1 U/мг в 2,0 мл 0,1 М ПИПДЭС-буфера), также уравнивали при 37 °С, при этом концентрация пролекарственного средства в получающемся конечном растворе составляла 1 мМ, а активность фермента — 375 U/мл. Из гидролизуемых смесей отбирали аликвоты (150 мкл), охлаждали их до 0 °С, за кинетикой процессов следили методом ТСХ с помощью УФ-детекции (система б — контроль деградации соединений V и VII, система в — соединения IXа; система г — контроль накопления AZT и 2-псевдомоноглицеридов при гидролизе конъюгатов V и VII), время половинного гидролиза исходных соединений, а также динамику образования продуктов гидролиза оценивали по графикам зависимостей концентраций соответствующих соединений от времени.

Общая методика приготовления липосом и определения их размеров. Получение МЛВ: смесь соевого фосфатидилхолина, холестерина и пролекарственных соединений V, VII, IXа, взятых в различных соотношениях, переупаривали из хлороформа (5 мл) в круглодонной колбе, получая липидную плёнку, которую диспергировали водой: добавляли воду (концентрация липидов в воде 20 мг/мл) и замораживали-оттаивали в жидком азоте до полного исчезновения липидной плёнки с образованием однородной суспензии МЛВ молочно-белого цвета.

Получение ОЛВ: полученную дисперсию МЛВ озвучивали на ультразвуковой бане (2 × 1,5 мин), а затем подвергали экструзии через ядерные фильтры под давлением. Для этого в разборном металлическом блоке закрепляли поликарбонатный ядерный фильтр (на 100 нм или на 200 нм) и 2 микрошприца на 1 мл, дисперсию МЛВ набирали в один из шприцов и продавливали через фильтр во второй, а затем — обратно. Продавливание осуществляли нечётное количество раз (19 раз), чтобы исключить присутствие частиц, не способных пройти через фильтр, в конечном образце. ОЛВ получали в виде прозрачного слегка опалесцирующего раствора. Средний диаметр полученных однослойных липосом определяли методом турбидиметрии, снимая спектр их мутности в интервале 500 – 750 нм.

Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках аналитической ведомственной целевой программы “Развитие научного потенциала высшей школы, 2009 – 2011 г.г.” Федерального агентства по образованию РФ (проект № 2.1.1/2715).

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Clercq, *J. Clin. Virol.*, **30**, 115 – 133 (2004).
2. R. F. Schinazi, B. I. Hernandez-Santiago, and S. J. Hurwitz, *Antivir. Res.*, **71**, 322 – 334 (2006).
3. E. Clercq, *Antivir. Res.*, **67**, 56 – 75 (2005).
4. W. N. Charman and C. J. H. Porter, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **19**, 149 – 169 (1996).
5. D. M. Lambert, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**(2), S15 – S27 (2000).

6. A. Wong and I. Toth, *Cur. Med. Chem.*, **8**(9), 1123 – 1136 (2001).
7. N. L. Trevaskis, W. N. Charman, and C. J. H. Porter, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 702 – 716 (2008).
8. G. K. E. Scriba, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **326**, 477 – 481 (1993).
9. M. Lalanne, A. Paci, K. Andrieux, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2237 – 2240 (2007).
10. R. L. Mackman and T. Cihlar, *Ann. Rep. Med. Chem.*, **39**, 305 – 321 (2004).
11. T. Kamijo, H. Narada, and K. Iizuka, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 5044 – 5047 (1984).
12. F. Bonina, C. Puglia, M. G. Rimoli, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16**, 167 – 174 (2002).
13. А. Ю. Замятина, А. С. Бушнев, В. И. Швец, *Биоорганическая химия*, **20**(12), 1253 – 1296 (1994).
14. I. Lindh and J. Stawiński, *J. Org. Chem.*, **54**(6), 1338 – 1342 (1989).
15. О. А. Тучная, О. В. Горлачук, В. А. Лившиц и др., *Хим.-фарм. журн.*, **42**(1), 6 – 12 (2008).
16. Н. С. Шастина, О. А. Тучная, Л. И. Эйнисман и др., *Биоорганическая химия*, **29**(3), 296 – 302 (2003).
17. О. А. Тучная, С. Н. Елизарова, С. А. Шарикова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(5), 41 – 45 (2006).
18. G. K. E. Scriba, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **327**, 347 – 348 (1994).
19. G. K. E. Scriba, *Pharm. Res.*, **10**(8), 1181 – 1186 (1993).
20. K. Y. Hostetler, L. M. Stuhmiller, H. B. M. Lenting, et al., *J. Biol. Chem.*, **265**(11), 6112 – 6117 (1990).
21. А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец, *Ли-посомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике*, РА-Каравелла, Харьков (2001).
22. S. K. Sahoo, F. Dilnawaz, and S. Krishnakumar, *Drug Discovery Today*, **13**(3 – 4), 144 – 151 (2008).
23. E. Ojewole, I. Mackraj, P. Naidoo, and T. Govender, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **70**, 697 – 710 (2008).

Поступила 16.07.09

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF 3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE DERIVATIVES OF GLYCEROLIPIDS

D. V. Lonshakov, E. O. Baranova, A. I. Lyutik, N. S. Shastina*, and V. I. Shvets

Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 117571, Russia.

* e-mail: inosit@yandex.ru

A promising approach to enhancing the bioavailability of hydrophilic therapeutic agents including anti-HIV nucleosides is designing their pseudotriglyceride derivatives that may mimic natural lipids and take advantage of their metabolic pathways resulting in improved delivery to target cells. The synthesis of a series of new 1,3-diglycerides and AZT conjugates employing various linkage types between the pharmacophore residue and the spacer part of hydrophobic moiety (ester or phosphodiester) is described. The hydrolytic properties of the synthesized liponucleosides (in buffer solutions and under pancreatic lipase action) have been studied and liposomes based on these AZT-containing prodrugs have been obtained.

Key words: 3'-azido-3'-deoxythymidine, liponucleosides, glycerides, prodrugs, bioavailability