



УДК 577.113.3.017

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 5'-АРИЛФОСФОНАТОВ α -ТИМИДИНА

© 2013 г. М. А. Иванов¹, И. Л. Карпенко¹, Л. Н. Черноусова²,
С. Н. Андреевская², Т. Г. Смирнова², Л. А. Александрова^{1, #}

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²ФГБУ “Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза” РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

Поступила в редакцию 20.03.2013 г. Принята к печати 24.05.2013 г.

Взаимодействием имидазolidов диэтилфосфоноксусной кислоты с метил 4-аминобензоатом или 3,5-бис(трифторметил)фениламинол получены диэтил(*N*-ариламинокарбонил)метилфосфонаты, обработка которых Me_3SiBr в DMF приводила к смеси соответствующих (*N*-ариламинокарбонилметил)фосфоновых кислот и их моноэтиловых эфиров. После разделения те и другие конденсировались с 3'-*O*-ацетил- α -тимидином, что, после удаления ацетильной защиты, приводило к (α -*D*-тимидин-5'-ил)-[4-(аминокарбонил-, метоксикарбонил- или карбокси)фениламинокарбонил]метилфосфонатам и к (α -*D*-тимидин-5'-ил)-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонату и их этиловым эфирам. Показано, что соединения стабильны в различных условиях, низкотоксичны (на культурах клеток *Vero* и K-562) и способны проникать в клетки K-562. Только этил-(α -*D*-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат в высокой концентрации (200 мкг/мл) ингибировал рост *in vitro* лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Ключевые слова: нуклеозиды, α -тимидин, фосфонаты, синтез, цитотоксичность, стабильность, туберкулез, микобактерии, антимикуобактериальная активность, *Mycobacterium tuberculosis*.

DOI: 10.7868/S0132342313060055

В XX веке созданы эффективные антибиотики и противовирусные препараты, позволившие значительно снизить смертность от инфекционных заболеваний. Однако, к настоящему времени большинство патогенных микроорганизмов и вирусов выработали резистентность к основному пулу используемых для их терапии лекарств, что делает необходимым поиск новых классов соединений, ингибирующих рост патогенных бактерий и вирусов [1].

Туберкулез (ТБ), являясь причиной ежегодной смертности около двух миллионов человек, занимает второе место в мире среди инфекционных заболеваний после СПИДа [2]. Наличие у человека сразу двух этих заболеваний значительно утяжеляет клиническую картину протекания каждого. В 1993 году ВОЗ объявила о глобальной критической ситуации по ТБ. Особо следует отметить возникновение новых резистентных штаммов

Mycobacterium tuberculosis: множественно лекарственно устойчивого и практически неизлечимого “экстенсивно лекарственно устойчивого” [2], на которые стандартные схемы химиотерапии практически не действуют. Поэтому необходим поиск новых анти-ТБ-препаратов.

Среди модифицированных нуклеозидов, проявивших заметное антимикуобактериальное действие *in vitro*, значительную анти-ТБ-активность показали ингибиторы тимидинмонофосфаткиназы *M. tuberculosis* (ТМРКmt) [3, 4]. Сравнение 5'-дезоксис-5'-(*N*-арилтиокарбамидных)-производных α -тимидина [3] и его ариламинокрбонилфосфонатов с помощью программного комплекса “Molecular Operating Environment (MOE)” [5] продемонстрировало пространственное сходство этих соединений.

Целью нашей работы был синтез ряда фосфонатных производных α -тимидина, изучение их стабильности в различных условиях, токсичности на культурах клеток а также ингибирующего действия на рост *M. tuberculosis*.

Сокращения: DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, CDI — *N,N'*-карбонилдимидазол, PBS — фосфатносолевой буфер, HFBA — гептафтормасляная кислота, КОЕ — колониобразующая единица.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-60-65; факс: +7 (499) 135-14-05; эл. почта: ala2004_07@mail.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез фосфонатных производных α -тимидина проводили по аналогии с методом, описанным в работе [6] (схемы 1 и 2). Первой стадией синтеза являлась конденсация диэтилфосфоуксусной кислоты (I) с соответствующим фениламиноанилином. Активация кислоты (I) через образование имидзолида (CDI в DMF [7]) и последующее его взаимодействие с метил-4-аминобензоатом или с 3,5-бис(трифторметил)фениламиноном приводило к ди-*O*-этил-(*N*-(4-метоксикарбонил)фениламинокарбонил)метилфосфонату (II) и ди-*O*-этил-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонату (IX) соответственно.

N-Ариламинокарбонилметилфосфоновые кислоты (III) и (X) и их моноэтиловые эфиры (IV) и (XI) получали мягкой обработкой диэфиров (II) и (IX) триметилбромсиланом в DMF и выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе и обращенно-фазном силикагеле. Взаимодействие производных (III), (X), (IV) и (XI) с 3'-*O*-ацетил- α -тимидином в пиридине в присутствии DCC [8] приводило к (3-*O*-ацетил- α -*D*-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонату (V) и (3-*O*-ацетил- α -*D*-тимидин-5'-ил)-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонату (XII) и соответствующим этиловым эфирам (VI) и (XIII) (схемы 1, 2).

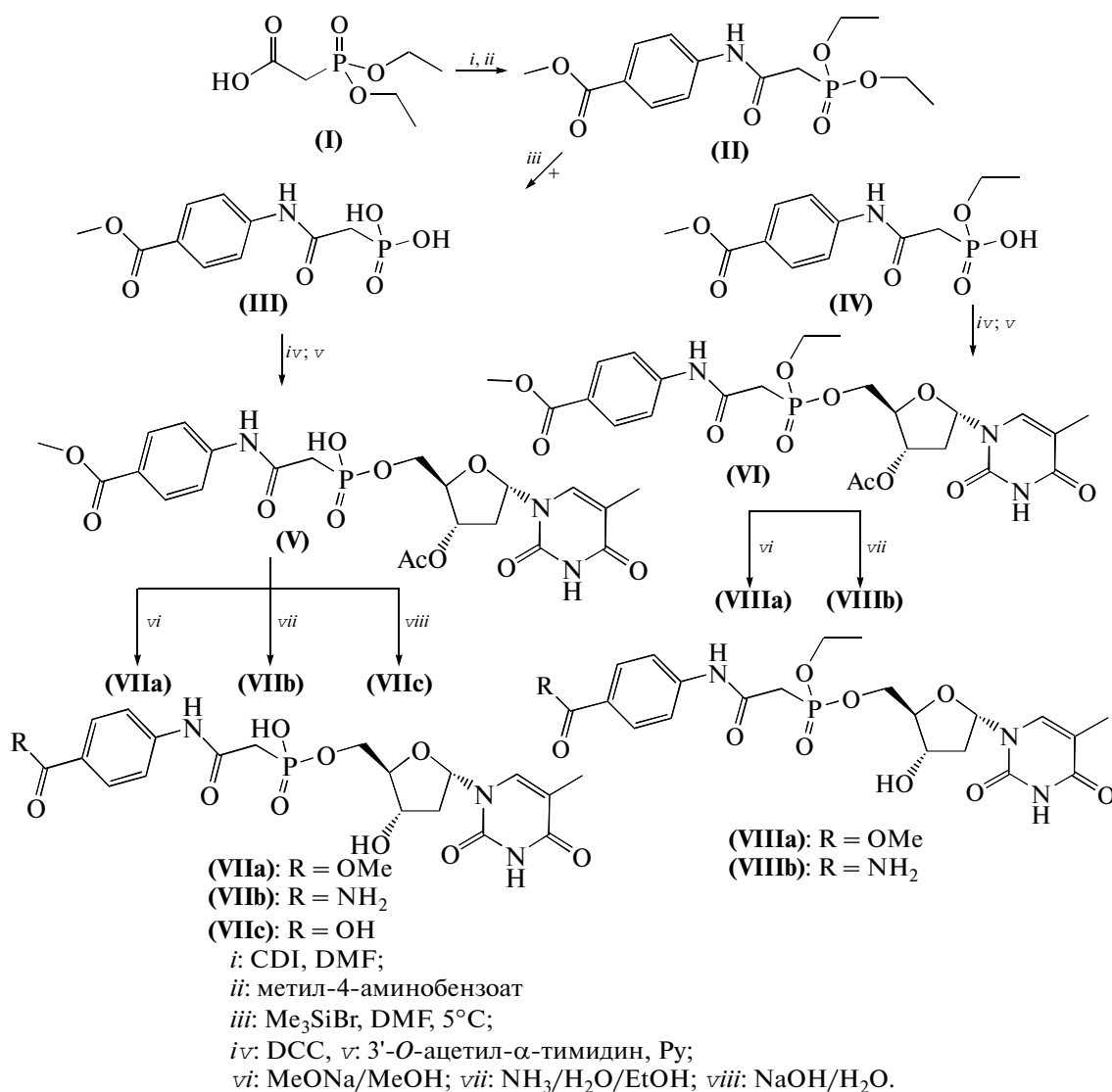


Схема 1.

α -*D*-Тимидин-5'-ил-[4-(метоксикарбонил-, аминкарбонил- и карбокси)фениламинокарбонил]метилфосфонаты (VIIa–с) и их этиловые эфи-

ры (VIIIa, b) получали действием на соединения (V) или (VI) метилата натрия в метаноле, водным аммиаком, или водным раствором щелочи (в случае V)

соответственно (схема 1). Соединения (**VIIa–c**) выделяли колоночной хроматографией на обращенно-фазном силикагеле LiChroprep RP-8 с выходами 53 мг (95%), 40 мг (75%) и 21 мг (80%) соответственно.

Соединения (**VIIIa, b**) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в линейном градиенте концентраций этанола в дихлорметане с выходами 54 мг (95%) и 45 мг (82%) соответственно.

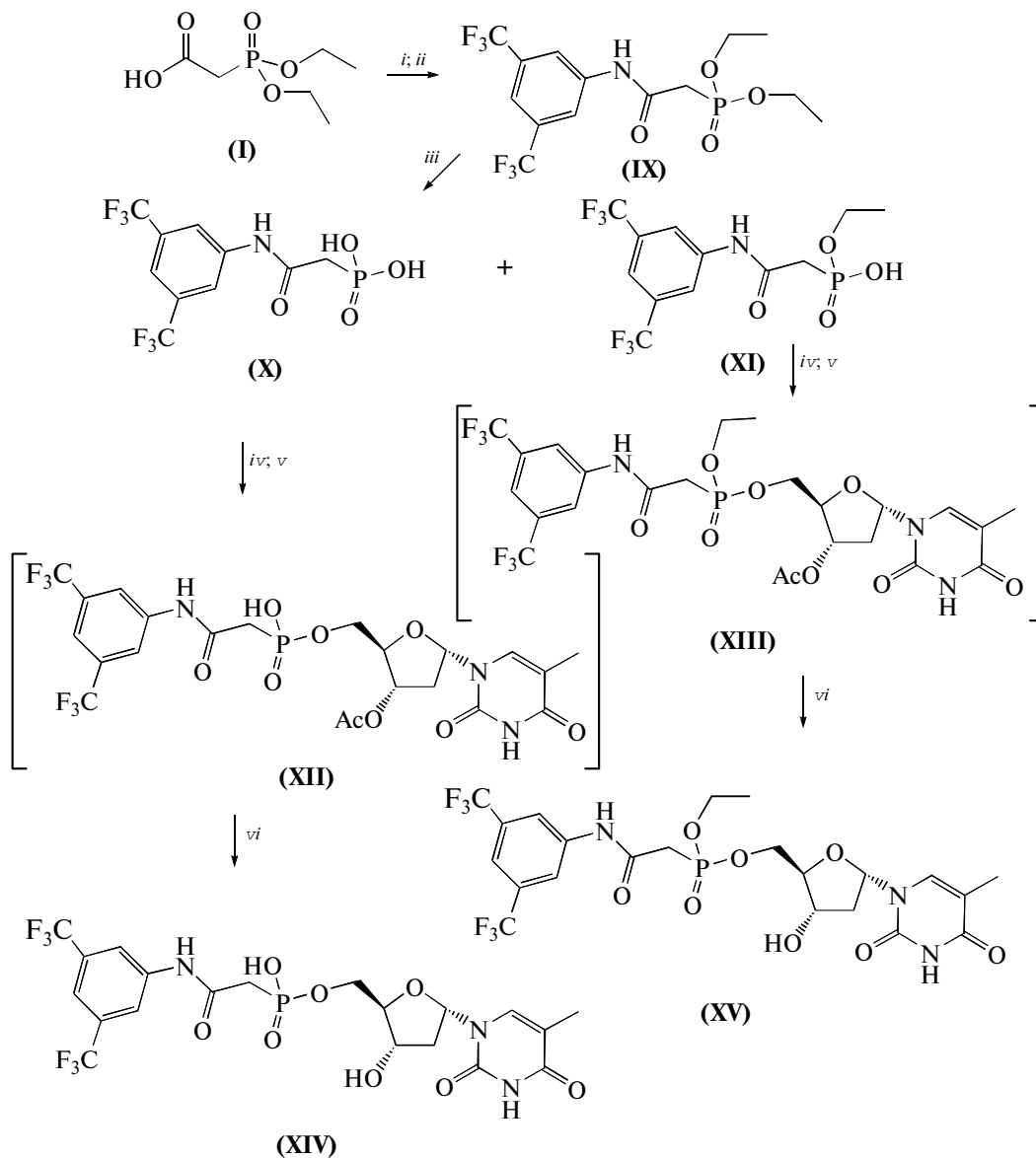


Схема 2.

α-*D*-Тимидин-5'-ил-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (**XIV**) и его этиловый эфир (**XV**) получали без выделения промежуточных ацетилированных производных (**XII**) и (**XIII**). Обработка реакционной смеси, полученной при конденсации соединений (**X**) и (**XI**) с 3'-*O*-ацетил-α-тимидином водно-спиртовым раствором аммиака, приводила к целевым продуктам (**XIV**) и (**XV**) (схема 2), которые затем выделяли хроматографией на колонках с силикагелем в ли-

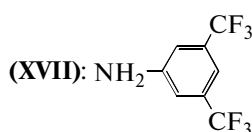
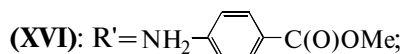
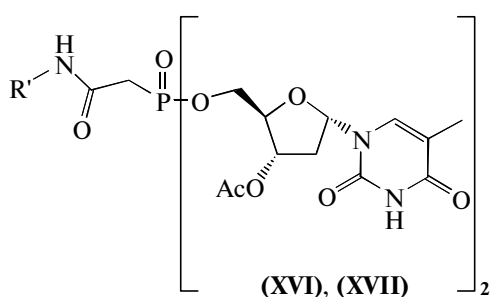
ной при конденсации соединений (**X**) и (**XI**) с 3'-*O*-ацетил-α-тимидином водно-спиртовым раствором аммиака, приводила к целевым продуктам (**XIV**) и (**XV**) (схема 2), которые затем выделяли хроматографией на колонках с силикагелем в ли-

нейном градиенте концентраций этанола в дихлорметане с выходами 144 мг (81%) и 152 мг (84%) соответственно.

Структура синтезированных соединений подтверждена УФ-, ^1H -, ^{31}P - и ^{13}C -ЯМР-спектрами. В ЯМР-спектрах всех соединений присутствует характерный сигнал фосфонатной метиленовой группы с константой спин-спинового взаимодействия: в спектрах ^1H -ЯМР $J_{\text{CH}_2\text{P}, \text{P}} = 18.0\text{--}21.0$ Гц, в спектрах ^{13}C ЯМР $J_{\text{CH}_2\text{P}, \text{P}} = 122.0\text{--}130.0$ Гц [9].

Этилфосфонаты (VI), (VIIIa, b) и (XV) представляют собой смесь диастереомеров. Так как в ходе синтеза их разделение не проводилось, ЯМР-спектры данных соединений содержат две группы сигналов, что соответствует смеси двух изомеров в соотношении примерно 1 : 1. Разрешение прибора позволило соотнести химические сдвиги и большинство констант спин-спинового взаимодействия каждого изомера с помощью данных из работы [9] (см. экспериментальную часть). Различие в химических сдвигах наблюдалось для атомов, находящихся на расстоянии 1–3, реже 4–5 связей от хирального центра – атома фосфора и составляло ~ 0.01 м.д., константа спин-спинового взаимодействия ~ 0.1 Гц. Например, сигналы метиленовых групп фосфонацетатного остатка изомеров этил-(α -D-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфоната (VI–IIa) равны 3.19 и 3.18 м.д., константы $J_{\text{CH}_2\text{P}, \text{P}} - 21.6$ и 21.7 Гц соответственно. Химические сдвиги атомов тимина и ароматических остатков обоих изомеров совпадали.

В процессе конденсации соединений (III) и (X) с α -тимидином наблюдалось образование бистимидиновых производных (XVI) и (XVII), которые были выделены препаративной ТСХ с выходами 6 и 8% (исходя из соединений (III) и (X)) соответственно.



В бистимидиновых производных (XVI) и (XVII), вследствие большого объема нуклеозидных остатков при атоме фосфора, последние принимают различные конформации. В результате некоторые сигналы протонов ($\text{H1}'$, H6) в ^1H -ЯМР спектрах неэквивалентны и присутствуют в виде двойного набора.

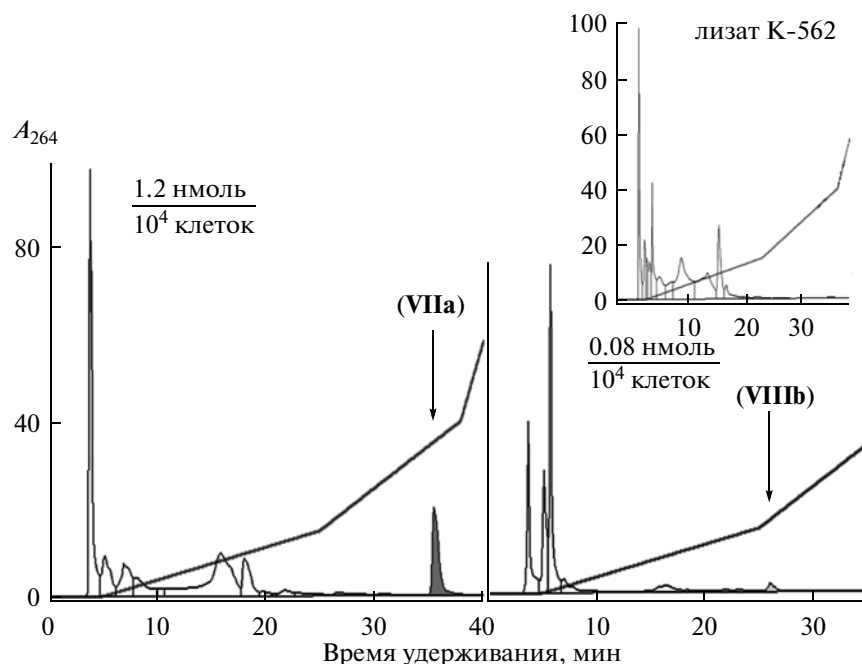
Определение стабильности соединений в условиях химического и ферментативного гидролиза входит в стадию предклинических испытаний соединений с потенциальной лекарственной активностью. Анализ возможных продуктов конверсии соединений (VIIa–c), (VIIIa, b), (XIV) и (XV) проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Соединения были устойчивы к химическому гидролизу более 24 ч при трех различных значениях pH: 2.2 (глицин-HCl); 7.4 (фосфатно-солевой буфер) и 9.0 (глицин-NaOH).

Стабильность соединений к ферментативному гидролизу определяли в фетальной сыворотке теленка. Все соединения были стабильны в этих условиях более 24 ч. Цитотоксичность исследованных соединений определяли по методикам работы [10]. Соединения (VIIa–c), (VIIIa, b), (XIV) и (XV) не проявили токсичности на культурах клеток *Vero* и K-562 до концентраций 500 и 250 мкМ соответственно, что близко или выше токсичности большинства описанных в литературе ингибиторов тимидинмонофосфат киназы *M. tuberculosis* [3, 4].

Одним из факторов, влияющих на активность соединений, является скорость их накопления и возможная последующая конверсия внутри клеток. Мы изучили накопление фосфонатов (VIIa) и (VIIb) в клетках миелоидной лейкемии K-562 с использованием метода ВЭЖХ. После инкубации клеток с фосфонатами, эти соединения достоверно определялись в клеточных лизатах. Как можно видеть из рисунка, уровень накопления 4-метоксикарбонильного производного (VIIa) значительно превышает количество 4-аминокарбонильного производного (VIIb) в клетке. Из профиля элюции видно, что в клеточных лизатах отсутствуют продукты конверсии соединений (VIIa) и (VIIb).

Антимикобактериальное действие синтезированных соединений изучали с использованием автоматизированной системы Vactec MGIT960 [11], определяя их бактериостатическую активность в отношении лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv по разработанному ранее методу [12]. Только фосфонат (VIIIa) в высокой концентрации (200 мкг/мл) ингибировал рост микобактерии, остальные соединения оказались неактивны.

Таким образом, несмотря на пространственное сходство синтезированных ариламинокарбонилфосфонатов 2'-дезоксид- α -тимидина с 5'-дезоксид-5'-(N-арилтиокарбамидными) производными α -тимидина они (за исключением соедине-



Накопление фосфонатов α -тимидина (VIIa) и (VIIb) в клетках миелоидной лейкемии К-562 (24 ч). Кривые элюции проб лизата клеток К-562 через 24 ч инкубации с соединениями. $T_{уд}$ (VIIa) = 37 мин; $T_{уд}$ (VIIb) = 26 мин. На врезке профиль элюции лизата клеток без инкубации с соединением. Условия элюции: см. "Эксперимент. часть".

ния VIIa) не ингибировали *in vitro* рост *M. tuberculosis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие реактивы фирм "Fluka" (Германия), "Aldrich", "Sigma" (США) и "Acus" (Бельгия). Растворители очищали по стандартным методикам. Исходные α -D-тимидин и 3'-O-ацетил-2'-дезоксид- α -D-тимидин получены по методам, описанным в работах [3, 13].

Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel 60 (40–63 мкм), LiChroprep RP-8 (25–40 мкм) (Merck, Германия), DEAE-целлюлозе (Whatman, Англия); ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах хлороформ–этанол, 20 : 1 (А), хлороформ–этанол, 9 : 1 (Б), хлороформ–этанол, 4 : 1 (В), изопропанол–25% аммиак–вода, 7 : 1 : 3 (Г), диоксан–25% аммиак, 8 : 2 (Д) или диоксан–25% аммиак–вода, 6 : 1 : 4 (Е). Препаративную ТСХ проводили на пластинах 20 × 20 см с силикагелем Kieselgel 60 F₂₅₄ с толщиной слоя 1 мм (Merck, Германия).

ВЭЖХ выполняли в псевдоионпарном режиме на обращенно-фазной колонке Nucleosil C-18 (4 × 150 мм, 5 мкм, Dr. Maisch GmbH, Германия), в градиенте концентраций 80% EtOH в 0.1% HFBA (рН 3): 0%, 5 мин, 0 → 15%, 20 мин; 15 → 40%, 13 мин; 40 → 100%, 7 мин.

Спектры ЯМР (δ , м.д., КССВ, Гц) регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker, США) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-ЯМР (внутренний стандарт – Me₄Si для DMSO-*d*₆ и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия (DSS) для D₂O), 101 МГц для ¹³C-ЯМР (внутренний стандарт – метанол) и 162 МГц для ³¹P-ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-2401P (Shimadzu, Япония).

O,O'-Диэтил-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (II). К раствору 392 мг (2 ммоль) 2-(диэтилфосфоно)уксусной кислоты в 5 мл сухого DMF добавляли 486 мг (3 ммоль) CDI. Перемешивали раствор в течение 1 ч при 20°C, затем добавляли 302 мг (2 ммоль) 4-метоксикарбониланилин и выдерживали смесь в течение 12 ч при 37°C. Контроль реакции ТСХ в системе А. Далее в смесь добавляли 1 мл H₂O, упаривали в вакууме и наносили на колонку с силикагелем (3.0 × 35 см, 40–63 мкм). Элюцию проводили в линейном градиенте концентраций этанола в дихлорметане (0 → 5%). Фракции, содержащие соединение (II), упаривали в вакууме. Выход фосфоната (II): 462 мг (70%). R_f 0.25 (А). УФ (H₂O), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹cm⁻¹): 269 (21850). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 10.40 (1 H, уш с, NH) 7.92 (2 H, д, $J_{m-Ph, o-Ph}$ 8.7, *m*-Ph), 7.70 (2 H, д, *o*-Ph), 4.06 (4 H, м, (CH₂CH₃)₂), 3.82 (3 H, с, CH₃O), 3.12 (2 H, д, $J_{CH_2P, P}$ 20.4, CH₂-

P), 1.24 (6 H, т, J 7.0, $(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), ^{31}P -ЯМР (D_2O) δ : 24, 19 с.

(4-Метоксикарбонилфениламинокарбонил)метилфосфонат (III) и **O-этил-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (IV)**. К раствору соединения (II) 247 мг (0.75 ммоль) в 5 мл сухого DMF при 5°C добавляли 0.5 мл (3.75 ммоль) Me_3SiBr , реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при 5°C, затем добавляли 10 мл 25% раствора NH_3 и упаривали в вакууме. Полученный остаток растворяли в 10% водном этаноле (200 мл), наносили на колонку (7.5×25 см) с DEAE-целлюлозой (HCO_3^-). Колонку промывали 10% водным этанолом (150 мл) и далее элюировали в линейном градиенте концентраций $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ в 10% водном этаноле (0 \rightarrow 0.2 M, 800 мл). Фракции, содержащие соединения (III) и (IV), упаривали в вакууме досуха, растворяли в H_2O (1 мл) и наносили на колонку LiChroprep RP-8 (2×15 см, 25–40 мкм), элюция 0.01 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$.

Фракции, содержащие целевые соединения, лиофилизовали. Выход аммониевой соли соединения (III) 99 мг (30%). R_f 0.49 (Г). УФ (H_2O), λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 270 (22360). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.34 (1 H, уш с, NH) 7.82 (2 H, д, $J_{\text{m-Ph, o-Ph}}$ 8.7, m-Ph), 7.67 (2 H, д, o-Ph), 3.80 (3 H, с, CH_3O), 2.58 (2 H, д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 18.9, $\text{CH}_2\text{-P}$), ^{31}P -ЯМР (D_2O): 12.55 с. Выход аммониевой соли соединения (IV) 74 мг, (22.5%). R_f 0.57 (Г). УФ (H_2O), λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 272 (22150). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.16 (1 H, уш с, NH) 7.84 (2 H, д, $J_{\text{m-Ph, o-Ph}}$ 8.7, m-Ph), 7.70 (2 H, д, o-Ph), 3.80 (3 H, с, CH_3O), 3.73 (2 H, д кв, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3}$ $\sim J_{\text{POCH}_2, \text{P}}$ 7.0 CH_2CH_3), 2.53 (2 H, д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 18.6, $\text{CH}_2\text{-P}$), 1.08 (3 H, т, CH_2CH_3), ^{31}P -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.10 с.

O-(3'-O-Ацетил- α -D-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]-метилфосфонат (V). К раствору 100 мг (0.3 ммоль) соединения (III) и 129 мг (0.45 ммоль) 3'-O-ацетил- α -тимидина в сухом пиридине добавляли 500 мг (1.5 ммоль) DCC. Смесь выдерживали при 37°C в течение 12 ч. Контроль в системе Г. В реакционную массу добавляли 3 мл H_2O , упаривали в вакууме, остаток растворяли в 10% водном этаноле (200 мл) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^-) (3.5×25 см). Колонку промывали 10% водным этанолом (200 мл), целевые соединения элюировали линейным градиентом концентраций $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ в 10% водном этаноле (0 \rightarrow 0.15 M, 600 мл). Фракции, содержащие соединения (V) объединяли, упаривали в вакууме досуха. Выход аммонийной соли (V): 154 мг (88%) R_f 0.65 (Г). УФ (CH_3OH), λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 265 (26950).

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.03 (1 H, с, 3-NH), 7.87 (2 H, д, $J_{\text{m-Ph, o-Ph}}$ 8.7, m-Ph), 7.64 (2 H, д, o-Ph), 7.47 (1 H, с, H6), 5.86 (1 H, дд, J 7.1, 4.0, H1'), 5.19 (1 H, м, H3'), 4.54 (1 H, м, H4'), 3.84–3.78 (4 H, м, CH_3O , H5'a), 3.72 (1 H, м, H5'b), 3.33 (2 H, д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 22.5, $\text{CH}_2\text{-P}$), 2.74 (1 H, м, H2'), 2.00–1.95 (4 H, м, $\text{CH}_3\text{C(O)}$, H2''), 1.79 (3 H, с, 5- CH_3), ^{31}P -ЯМР (D_2O) δ : 13.27 с.

O-Этил-O-(3'-O-ацетил- α -D-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (VI). К раствору 103 мг (0.3 ммоль) соединения (IV) и 129 мг (0.45 ммоль) 3'-O-ацетил- α -тимидина в сухом пиридине добавляли 500 мг (1.5 ммоль) DCC. Смесь выдерживали при 37°C в течение 12 ч. Контроль в системе Б. В реакционную массу добавляли 1 мл H_2O , упаривали в вакууме. Соединение (VI) очищали на препаративных пластинах для ТСХ, используя в качестве элюэнта этилацетат. Выход (VI): 164 мг (90%), R_f 0.66 (Б). УФ (CH_3OH), λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 265 (27050). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.25 (1 H, уш с, Ar-NH), 11.50 (1 H, с, 3-NH), 7.91 (2 H, д, $J_{\text{m-Ph, o-Ph}}$ 8.7, m-Ph), 7.70 (2 H, д, o-Ph), 7.56 (1 H, с, H6), 6.18, 6.16 (1 H (дд, J 2.7, 1.2, изомер А; дд, J 2.7, 1.2, изомер Б) H1'), 5.19 (1 H, м, H3'), 4.69 (1 H, м, H4'), 4.15–4.07 (4 H, м, CH_2CH_3 , H5'), 3.82 (3 H, с, CH_3O), 3.22, 3.21 (2 H (д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 21.6, изомер А; д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 21.6, изомер Б) $\text{CH}_2\text{-P}$), 2.75 (1 H, м, H2''), 2.13, 2.09 (1 H (м, изомер А; м, изомер Б) H2''), 1.99 (3 H, с, $\text{CH}_3\text{C(O)}$), 1.80 (3 H, с, 5- CH_3), 1.258, 1.254 (3 H (т, J 6.9, изомер А; т, J 7.1, изомер Б) CH_2CH_3). ^{31}P -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 25.14 с, изомер А; 25.01 с, изомер Б.

O-(α -D-Тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (VIIa) К раствору 58 мг (0.1 ммоль) соединения (V) в 50 мл безводного MeOH, добавляли 0.3 мл 1 M раствора MeONa в MeOH, перемешивали 1 ч, добавляли 0.04 мл CH_3COOH , упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с H_2O (2×3 мл), растворяли в H_2O (1 мл) и наносили на колонку LiChroprep RP-8 (2×25 см, 25–40 мкм). Контроль в системе (Г). Фракции, содержащие соединения (VIIa), упаривали в вакууме. Выход (VIIa): 53 мг (95%), R_f 0.59 (Г). УФ (H_2O), λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 272 (27340). ^1H -ЯМР (D_2O) δ : 7.84 (2 H, д, $J_{\text{m-Ph, o-Ph}}$ 8.7, m-Ph), 7.51 (2 H, д, o-Ph), 7.32 (1 H, с, H6), 5.86 (1 H, дд, J 7.1, 4.0, H1'), 4.49 (2 H, м, H3', H4'), 4.03 (1 H, ддд, J 5'_a, 5'_b, 11.2, J 5'_a, P, 4.9, J 5'_a, 4, 2.6, H5'_a), 3.89 (1 H, м, H5'b), 3.85 (3 H, с, CH_3O), 2.92 (2 H, д, $J_{\text{CH}_2\text{P, P}}$ 20.3, $\text{CH}_2\text{-P}$), 2.62 (1 H, м, H2''), 1.93 (1 H, ддд, J 14.4, 4.0, 3.9, H2''), 1.74 (3 H, с, 5- CH_3), ^{31}P -ЯМР (D_2O) δ : 16.40 с, ^{13}C -ЯМР (D_2O): 171.10

(C(O)Ph), 169.86 (д, $J_{C(O),P}$ 5.3, C(O)CH₂), 168.86 (C4), 153.69 (C2), 145.04 (*unco*-Ph), 140.26 (C6), 133.11 (*m*-Ph), 127.52 (*n*-Ph), 122.52 (*o*-Ph), 112.91 (C5), 89.54 (C1'), 89.29 (д, $J_{C4',P}$ 7.6 C4'), 73.62 (C3'), 67.41 (д, $J_{C5',P}$ 5.8, C5'), 55.31 (CH₃O), 42.31 (C2'), 40.20 (д, $J_{CH_2,P}$ 122.0, CH₂-P), 14.24 (5-CH₃).

O-(α-D-Тимидин-5'-ил)-[4-(аминокарбонил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (VIIb). К раствору 58 мг (0.1 ммоль) соединения (V) в 100 мл этанола, добавляли 50 мл водного раствора NH₃ (25%), выдерживали раствор 12 ч, упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с H₂O (2 × 3 мл), растворяли в H₂O (1 мл) и наносили на колонку LiChroprep RP-8 (2 × 25 см). Контроль в системе (Г). Фракции, содержащие соединение (VIIb), упаривали в вакууме. Выход аммонийной соли (VIIb): 40 мг (75%), R_f 0.55 (Г). УФ (H₂O), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 268 (20000). ¹H-ЯМР (D₂O) δ : 7.67 (2 H, д, $J_{m-Ph, o-Ph}$ 8.7, *m*-Ph), 7.48 (2 H, д, *o*-Ph), 7.41 (1 H, с, H6), 5.85 (1 H, дд, J 7.1, 3.9, H1'), 4.37 (2 H, м, H3', H4'), 4.02 (2 H, ддд, J 5.1, 5.1, 5.1, H5'a, 4', 3.1, H5'a), 3.89 (1 H, ддд, H5'b) 2.91 (2 H, д, $J_{CH_2,P}$ 20.2, CH₂-P), 2.62 (1 H, м, H2'), 1.93 (1 H, ддд, J 14.4, 3.7, 3.7, H2''), 1.74 (3 H, с, 5-CH₃), ³¹P-ЯМР (D₂O): 16.40 с. ¹³C-ЯМР (D₂O) δ : 174.27 (NH₂C(O)), 171.00 (д, $J_{C(O),P}$ 5.3, C(O)CH₂), 169.20 (C4), 153.97 (C2), 143.86 (*unco*-Ph), 140.47 (C6), 131.19 (*m*-Ph), 130.86 (*n*-Ph), 123.00 (*o*-Ph), 113.12 (C5), 89.64 (C1'), 89.37 (д, $J_{C4',P}$ 7.1 C4'), 73.46 (C3'), 67.43 (д, $J_{C5',P}$ 5.7, C5'), 42.17 (C2'), 40.10 (д, $J_{CH_2,P}$ 122.5 CH₂-P), 14.30 (5-CH₃).

O-(α-D-Тимидин-5'-ил)-[4-карбоксифениламинокарбонил]метилфосфонат (VIIc). К раствору 29 мг (0.05 ммоль) соединения (V) в 100 мл H₂O, добавляли 0.2 мл 1 М раствора NaOH в воде, раствор перемешивали 1 ч, упаривали в вакууме досуха, добавляли 0.04 мл CH₃COOH, раствор упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с H₂O (2 × 3 мл), растворяли в H₂O (1 мл) и наносили на колонку LiChroprep RP-8 (2 × 25 см, 25–40 мкм). Контроль в системе (Г). Фракции, содержащие соединение (VIIc), упаривали в вакууме. Выход продукта (VI–Ic): 21 мг (80%), R_f 0.48 (Г). УФ (H₂O), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 269.1 (23000). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 10.70 (1 H, с, 3-NH), 7.81 (2 H, д, J 8.7 *m*-Ph), 7.73 (1 H, с, H6), 7.60 (1 H, д, *o*-Ph), 6.08 (1 H, дд, J 7.6, 3.1, H1'), 4.28 (1 H, м, H4'), 4.23 (1 H, м, H3'), 3.71 (2 H, м, H5'), 3.18 (2 H, д, $J_{CH_2,P}$ 20.6, CH₂-P), 2.59 (1 H, м, H2'), 1.83 (1 H, м, H2''), 1.76 (3 H, с, 5-CH₃), ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 13.60 с.

O-Этил-O'-(α-D-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]-метилфосфонат

(VIIa). К раствору 61 мг (0.1 ммоль) соединения (V) в 50 мл безводного MeOH, добавляли 0.3 мл 1 М раствора MeONa в MeOH, перемешивали раствор 1 ч, добавляли 0.04 мл CH₃COOH, упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с H₂O (2 × 3 мл). Контроль в системе (Б). Остаток наносили на колонку с силикагелем (2.0 × 25 см, 40–63 мкм). Элюцию проводили в линейном градиенте концентраций этанола в дихлометане (0 → 9%). Фракции, содержащие соединение (VIIa), упаривали в вакууме. Выход (VIIa) 54 мг (95%), R_f 0.36 (Б). УФ (CH₃OH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 270 (22620). ¹H-ЯМР ((DMSO-*d*₆) δ : 11.21 (1 H, с, Ar-NH), 10.40, 10.41 (1 H (с, изомер А; с, изомер Б) 3-NH), 7.91 (2 H, д, $J_{m-Ph, o-Ph}$ 8.5 *m*-Ph), 7.72 (1 H, с, H6), 7.69 (2 H, д, *o*-Ph), 6.14, 6.13 (1 H (дд, J 7.4, 3.6, изомер А; дд, J 7.4, 3.9 изомер Б) H1'), 5.46 (1 H, д, $J_{3'OH,3'}$ 3.3, 3'-OH), 4.32 (1 H, м, H3'), 4.27 (1 H, м, H4'), 4.05 (4 H, м, H5', CH₂CH₃), 3.82 (3 H, с, CH₃O), 3.19, 3.18 (2 H (д, $J_{CH_2,P}$ 21.6, изомер А; д, $J_{CH_2,P}$ 21.7 изомер Б) CH₂-P), 2.57 (1 H, м, H2'), 1.93, 1.92 (1 H, м, H2''), 1.77 (3 H, с, 5-CH₃), 1.24, 1.25 (3 H (т, J 7.0, изомер А; т, J 7.0, изомер Б) CH₂CH₃), ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 24.92 с, изомер А; 24.79 с, изомер Б.

O-Этил-O'-(α-D-тимидин-5'-ил)-[4-(аминокарбонил)фениламинокарбонил]-метилфосфонат (VIIb). К раствору 61 мг (0.1 ммоль) соединения (VI) в 100 мл EtOH, добавляли 50 мл водного раствора NH₃ (25%), выдерживали раствор 12 ч, упаривали в вакууме досуха, соупаривали с H₂O (2 × 3 мл). Контроль в системе (В). Остаток наносили на колонку с силикагелем (2.0 × 25 см, 40–63 мкм). Элюцию проводили в линейном градиенте концентраций этанола в дихлометане (0 → 15%). Фракции, содержащие соединение (VIIb), упаривали в вакууме. Выход (VIIb) 45 мг (82%), R_f 0.25 (В). УФ (CH₃OH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 272 (28050). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 11.20 (1 H, уш с, Ar-NH), 10.29, 10.28 (1 H, с, 3-NH), 7.82 (3 H, д, $J_{m-Ph, o-Ph}$ 8.7, *m*-Ph, с, H_a, NH₂), 7.74, 7.73 (1 H (с, изомер А; с, изомер Б) H6), 7.61 (2 H, д, *o*-Ph), 7.19 (1 H, с, H_b, NH₂) 6.16, 6.15 (1 H (дд, J 7.6, 3.6, изомер А; дд, J 7.4, 3.9, изомер Б) H1'), 5.48 (1 H, д, $J_{3'OH,3'}$ 3.4, 3'-OH), 4.27 (1 H, м, H3'), 4.32 (1 H, м, H4'), 4.05 (4 H, м, H5', OCH₂CH₃), 3.17, 3.16 (2 H (д, $J_{CH_2,P}$ 21.6, изомер А; д, $J_{CH_2,P}$ 21.6, изомер Б) CH₂-P), 2.58 (1 H, м, H2'), 1.94, 1.93 (1 H (ддд, J 14.3, 3.8, 3.6, изомер А; ддд, J 14.1, 3.6, 3.4, изомер Б) H2''), 1.78 (3 H, с, 5-CH₃), 1.25, 1.24 (3 H (т, J 7.0, изомер А; т, J 7.0, изомер Б) CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 25.15 с, изомер А; 25.02 с, изомер Б. ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 167.29 (2 H, с, NH₂C(O)), 163.76 (C4), 163.16 (д, $J_{C(O),P}$ 5.8, C(O)CH₂), 150.44 (C2), 141.30

(*unco*-Ph) 136.68 (C6), 129.11 (*n*-Ph), 128.37 (*m*-Ph), 118.17 (*o*-Ph), 108.85 (C5), 85.95, 85.80 ((д, $J_{C4',P}$ 6.7, изомер А; д, $J_{C4',P}$ 7.1, изомер Б) C4'), 85.17, 85.12 ((с, изомер А; с, изомер Б) C1'), 70.78, 70.05 ((с, изомер А; с, изомер Б) C3'), 65.48 (м, C5'), 62.12, 62.09 ((д, $J_{POCH_2,P}$ 6.2, изомер А; д, $J_{POCH_2,P}$ 5.8, изомер Б) $\underline{C}H_2CH_3$), 39.70 (C2'), 35.79 (д, $J_{CH_2,P}$ 131.9 CH_2 -P), 16.14, 16.07 (1 С (с, изомер А; с, изомер Б) $CH_2\underline{C}H_3$), 12.23 (5- CH_3).

О,О'-Диэтил-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (IX). К раствору 392 мг (2 ммоль) 2-(диэтилфосфоно)уксусной кислоты (I) в 5 мл сухого DMF добавляли 486 мг (3 ммоль) CDI. Перемешивали раствор при 20°C в течение 1 ч, затем добавляли 458 мг (2 ммоль) 3,5-бис(трифторметил)фениламина и выдерживали смесь при 37°C 5 ч. Контроль в системе А. Далее в смесь добавляли 1 мл H₂O, упаривали в вакууме и наносили на колонку с силикагелем (3.0 × 35 см). Элюцию проводили в дихлорметане. Фракции, содержащие соединение (IX), упаривали в вакууме. Выход диэфира (IX): 612 мг (75%), R_f 0.57 (А). УФ (EtOH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 242 (12650). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 12.42 (1 H, уш с, Ar-NH), 8.16 (2 H, с, *o*-Ph), 7.22 (1 H, с, *n*-Ph), 4.25 (2 H, м, $\underline{C}H_2CH_3$), 3.37 (2 H, д, $J_{CH_2,P}$ 20.9, CH_2 -P), 1.34 (3 H, т, J 7.1 $CH_2\underline{C}H_3$), ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 24.66 с.

[3,5-Бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (X) и О-этил-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (XI). К раствору соединения (IX) 408 мг (1,0 ммоль) в 7 мл сухого DMF при 5°C добавляли 0.66 мл (5.0 ммоль) Me₃SiBr, реакционную смесь перемешивали при 5°C 12 ч, затем добавляли 15 мл 25% раствора NH₃ и упаривали в вакууме. Контроль в системе (Г). Полученный остаток растворяли в 300 мл 10% спирта, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻) (7.5 × 25 см). Колонку промывали 10% водным этанолом (200 мл), затем в линейном градиенте концентраций (NH₄)HCO₃ в 10% водном этаноле (0.05 → 0.2 М, 1000 мл). Фракции, содержащие соединения (IX) или (X), упаривали в вакууме досуха, растворяли в H₂O (1 мл) и наносили на колонку LiChroprep RP-8 (2 × 15 см). Элюция 0.01 М (NH₄)HCO₃. Фракции, содержащие целевые соединения, лиофилизировали и получали аммонийные соли соединений (X) или (XI). Выход аммонийной соли соединения (X) 123 мг (32%). R_f 0,62 (Г). УФ (EtOH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 242.4 (11890). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 12.56 (1 H, уш с, Ar-NH), 8.14 (2 H, с, *o*-Ph), 7.19 (1 H, с, *n*-Ph), 2.83 (2 H, д, $J_{CH_2,P}$ 20.7, CH_2 -P), ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 13.02 с. Выход аммонийной соли соединения (XI) 74 мг (28.0%), R_f 0.77 (Г). УФ

(EtOH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 244 (12460). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 12.18 (1 H, уш с, Ar-NH), 8.08 (2 H, с, *o*-Ph), 7.22 (1 H, с, *n*-Ph), 3.92 (2 H, д кв, $J_{CH_2CH_3} \sim \sim J_{POCH_2,P}$ 7.0 $\underline{C}H_2CH_3$), 2.78 (2 H, д, $J_{POCH_2,P}$ 20.5, CH_2 -P), 1.18 (3 H, т, $\underline{C}H_2\underline{C}H_3$), ³¹P-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 13.57 с.

О-(α -D-Тимидин-5'-ил)-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (XIV). К раствору 116 мг (0.3 ммоль) соединения (X) и 129 мг (0.45 ммоль) 3'-О-ацетил- α -тимидина в сухом пиридине добавляли 500 мг (1.5 ммоль) DCC. Смесь выдерживали при 37°C в течение 12 ч, затем добавляли 3 мл H₂O, упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 150 мл спирта, добавляли 50 мл 25% водного раствора NH₃, выдерживали реакционную смесь при 5°C 12 ч. Контроль в системе (Д). Затем упаривали в вакууме, остаток растворяли в 15% водном этаноле (100 мл), наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻) (3.5 × 25 см). Колонку промывали 15% водным этанолом (200 мл), затем элюировали в линейном градиенте концентраций (NH₄)HCO₃ в 15% водном этаноле (0 → 0.25 М, 600 мл). Фракции, содержащие соединение (XIV) объединяли, упаривали в вакууме досуха. Выход аммонийной соли (XIV): 144 мг (81%), R_f 0.65 (Д). УФ (CH₃OH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 248 (14185). ¹H-ЯМР (D₂O): 7.99 (2 H, с, *o*-Ph), 7.75 (1 H, с, *n*-Ph), 7.46 (1 H, с, H6), 5.86 (1 H, дд, J 6.8, 3.2, H1'), 4.41 (2 H, м, H3', H4'), 4.05 (1 H, м, H5'a), 3.92 (1 H, м, H5'b), 2.96 (2 H, д, $J_{POCH_2,P}$ 20.5, CH_2 -P), 2.66 (1 H, м, H2'), 1.97 (1 H, м, H2''), 1.76 (3 H, с, 5- CH_3), ³¹P-ЯМР (D₂O): 16.10 с.

О-Этил-О'-(α -D-Тимидин-5'-ил)-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]-метилфосфонат (XV). К раствору 116 мг (0.3 ммоль) соединения (X) и 129 мг (0.45 ммоль) 3'-О-ацетил- α -тимидина в сухом пиридине добавляли 500 мг (1.5 ммоль) DCC. Смесь выдерживали при 37°C в течение 12 ч. Затем в реакционную массу добавляли 3 мл H₂O, упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 150 мл спирта, добавляли 50 мл 25% водного раствора NH₃, выдерживали реакционную смесь в течение 12 ч при 5°C. Контроль в системе (Б). Соединение (XV) очищали на препаративных пластинах для ТСХ, используя в качестве элюэнта этилацетат, насыщенный водой. Выход метилфосфоната (XV): 152 мг (84%), R_f 0.66 (Б). УФ (CH₃OH), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 248.6 (14185). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆) δ : 11.20 (1 H, с, Ar-NH), 10.80 (1 H, с, 3-NH), 8.20 (2 H, с, *o*-Ph), 7.75 (1 H, с, *n*-Ph), 7.71 (1 H, с, H6), 6.13, 6.12 (1 H (дд, J 7.6, 3.8, изомер А; дд, J 4.3, 8.2, изомер Б) H1'), 5.48 (1 H, д, $J_{3'OH,3'}$ 3.5, 3'-OH), 4.33 (1 H, м, H4'), 4.26 (1 H, м, H3'), 4.06 (4 H, м, H5', $\underline{C}H_2\underline{C}H_3$), 3.20 (2 H, д, $J_{CH_2,P}$ 21.6, CH_2 -P),

2.57 (1 H, м, H2'), 1.93 (1 H, м, H2''), 1.76 (3 H, с, 5-CH₃), 1.26, 1.25 (3 H (т, J 6.9, изомер А; т, J 6.9, изомер Б) CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР (DMSO-d₆): 24.39 с, изомер А; 24.27 с, изомер Б. ¹³C-ЯМР (DMSO-d₆) δ: 164.09 (1 C, д, J_{C(O), P} 5.8, C(O)CH₂), 163.81 (C4), 150.44 (C2), 140.56 (*unco*-Ph) 136.68 (C6), 130.88 (кв, J_{M-C, F} 33.3, *m*-Ph), 123.11 (кв, J 272.8 CF₃), 118.74 (*o*-Ph), 116.42 (м, *n*-Ph), 108.87 (C5), 85.91 (1 H, м, C4'), 85.20, 85.17 (C1'), 70.71, 70.76 (C3'), 65.69, 65.62 ((д, J_{C5', P} 6.7, изомер А; д, J_{C5', P} 8.0, изомер Б) C5'), 62.32, 62.30 ((д, J_{POCH₂, P} 6.2, изомер А; д, J_{POCH₂, P} 6.2, изомер Б) CH₂CH₃), 39.70 (C2'), 35.94 (д, J_{CH₂, P} 131.9 CH₂-P), 16.14, 16.08 ((с, изомер А; с, изомер Б) CH₂CH₃), 12.22 (5-CH₃).

О,О'-Ди-(3'-О-ацетил-α-D-тимидин-5'-ил)-[4-(метоксикарбонил)фениламинокарбонил]-метилфосфонат (XVI). R_f 0.72 (Г). УФ (CH₃OH), λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ см⁻¹): 265 (36480). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ: 10.61 (1 H, уш с, Ar-NH), 7.89 (2 H, д, J_{M-Ph, o-Ph} 8.9, *m*-Ph), 7.71 (2 H, д, *o*-Ph), 7.49, 7.48 (2 H, 2 × с, H6), 6.17, 6.15 (1 H, 2 × дд, J 2.5, 1.7, H1'), 5.18 (2 H, м, H3'), 4.69 (2 H, м, H4'), 4.20–4.12 (4 H, м, H5'), 3.37 (2 H, д, J_{CH₂, P} 22.5, CH₂-P), 3.81 (3 H, с, CH₃O), 2.75 (2 H, м, H2'), 2.13–2.08 (2 H, м, H2''), 1.98, 1.97 (6 H, 2 × с, CH₃C(O)), 1.79 (6 H, с, 5-CH₃), ³¹P-ЯМР (DMSO-d₆) δ: 25.95 с.

О,О'-Ди-(3'-О-ацетил-α-D-тимидин-5'-ил)-[3,5-бис(трифторметил)фениламинокарбонил]метилфосфонат (XVII). R_f 0.81 (Г). УФ (EtOH), λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ см⁻¹): 244 (21480). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ: 11.23 (2 H, с, 3-NH), 10.95 (1 H, уш с, Ar-NH), 8.22 (2 H, с, *o*-Ph), 7.74 (1 H, с, *n*-Ph), 7.50, 7.49 (2 H, 2 × с, H6), 6.15 (2 H, дд, J 7.1, 2.5, H1'), 5.18 (2 H, м, H3'), 4.71 (2 H, м, H4'), 4.18 (4 H, м, H5'), 3.35 (2 H, д, J_{POCH₂, P} 20.2, CH₂-P), 2.74 (2 H, м, H2'), 2.11 (2 H, м, H2''), 1.97, 1.96 (6 H, 2 × с, CH₃C(O)), 1.79 (6 H, с, 5-CH₃), ³¹P-ЯМР (DMSO-d₆) δ: 25.26 с.

Эксперименты в клеточных культурах. Токсичность соединений была определена на культурах клеток почек африканских зеленых марышек *Vero* и миелоидной лейкомии К-562 (обе из коллекции клеточных культур ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздравсоцразвития России). Цитопатическое действие соединений оценивали МТТ-тестом через 72 ч инкубации [10].

Проникновение и накопление соединений на культуре клеток К-562. Культуру суспензионных клеток К-562 (2.14 × 10⁶ клеток/мл, 5 мл), выращенную в матрасах (25 см²), инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрации 1 мМ (5% СО₂, влажность 90%, 37°C) в течение 1, 5 и 24 ч. Клетки отделяли от культуральной среды осаждением на центрифуге К-23 (1000 об./мин, 10 мин,

4°C), затем двукратно отмывали от препарата ресуспендированием в PBS с последующим центрифугированием (3500 об./мин, 5 мин). Далее клетки ресуспендировали в равном объеме PBS, разведенном в соотношении 1 : 10, и разрушали добавлением 6% трихлоруксусной кислоты до конечного содержания 3% об./об., оставляли при температуре –20°C на 10 мин. Отбрасывали кислотонерастворимую фракцию после центрифугирования (13400 об./мин, 7 мин), затем супернатант нейтрализовали добавлением насыщенного раствора Na₂CO₃ (4.3 мкл на 100 мкл пробы). Полученные пробы лизата клеток К-562 анализировали методом ВЭЖХ в условиях приведенных выше. Идентификацию соединений проводили по времени удерживания, определенному для аутентичных контролей. Количество вещества в лизате клеток оценивали по ранее построенному калибровочному графику – веса пика вещества/количество вещества (mV/нмоль).

Штамм микобактерий. Для проведения испытаний препаратов использовали чувствительный к противотуберкулезным препаратам лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [14]. В работе использовали обогащенную жидкую питательную среду Дюбо (Difco).

Оценка эффективности препаратов. Изучение влияния препаратов на рост микобактериального штамма проводили на автоматической системе детекции роста Bactec MGIT 960 (BD, USA) стандартным методом [11] в течение 42 сут. Микобактериальную суспензию в объеме 500 мкл инокулировали в 7.9 мл питательной среды. Конечная концентрация *M. tuberculosis* в образце составляла 10⁵–10⁶ КОЕ/мл. Каждую из концентраций, включая контрольные пробирки без препарата, исследовали при трех повторах. Антимикобактериальное действие препаратов оценивали по динамике роста *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии различных концентраций препаратов по сравнению с ростом штамма на среде, не содержащей препаратов. Детекция роста проводилась каждый час автоматически и регистрировалась с помощью программного обеспечения Epicenter (BD, USA).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 11-04-00603 и 13-04-91441) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “По молекулярной и клеточной биологии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. // Nat. Chem. Biol. 2007. P. 541–548.

- Word Health Org., 2010. <http://www/who/int/media-centre/fastsheets/fs104/en/>.
- Van Daele I., Munier-Lehmann H., Froeyen M., Balzarini J., Van Calenbergh S. // J. Med. Chem. 2007. V. 50. P. 5281–5292.
- Van Calenbergh S., Pochet S., Munier-Lehmann H. // Curr. Top. Med. Chem. 2012. V. 12. P. 694–705.
- Molecular Operating Environment (MOE) 2012.10. Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canada.
- Shirokova E.A., Jasko M.V., Ivanov A.V., Yanvarev D.V., Kukhanova M.K., Pokrovsky A.G. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 3606–3614.
- Staab H.A. // Angewandte Chemie International Edition in English. 1962. V. 1. P. 351–367.
- Гауптман Э., Грефе Ю., Ремане Х. Органическая химия: Пер. с нем. М.: Химия, 1979. С. 77–249.
- Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений: Пер. с англ. М.: Мир; Бином, 2012. [Preich E., Bullmann P., Affolter C. Structure determination of organic compounds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2000.]
- Niks M., Otto M. // J. Immunol. Methods. 1990. V. 130. P. 149–151.
- Siddiqui S.H., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual: Foundation for Innovative New Diagnostics. Geneva, Switzerland, 2006. P. 41–51.
- Александрова Л.А., Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Ерохин В.В., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. // Acta Naturae. 2010. V. 3. P. 89–92.
- Ward D.I., Jeffs S.M., Coe P.L., Walker R.T. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 6779–6782.
- Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. // Пробл. туб. и болезн. легк. 2006. № 12. С. 43–48.

Synthesis and Biological Properties of α -Thymidine 5'-Aryl Phosphonates

M. A. Ivanov*, I. L. Karpenko*, L. N. Chernousova**, S. N. Andreevskaya**,
T. G. Smirnova**, L. A. Alexandrova*, #

#Phone: (499) 135-60-65, E-mail: ala2004_07@mail.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Central Tuberculosis Research Institute RAMS, Yauzskaya alleya 2, Moscow, 107564 Russia

The interaction of CDI-activated diethyl phosphonoacetate with methyl 4-aminobenzoate or 3,5-difluoromethylphenylamine followed by treatment with Me_3SiBr in DMF led to *N*-aryl aminocarbonylmethyl phosphonates and their ethyl esters. Their coupling with 3'-acetyl- α -thymidine followed by removal of the acetyl groups gave (α -*D*-thymidine-5'-il) *N*-[4-(methoxycarbonyl-, aminocarbonyl- and carboxy)phenyl]-aminocarbonylmethyl phosphonates, (α -*D*-thymidine-5'-il)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenylaminocarbonyl]methyl phosphonate and their ethyl esters. The phosphonates were stable in different conditions, low cytotoxic (in *Vero* and K562 cells) and were able to penetrate into K562 cells. The only ethyl ester of (α -*D*-thymidine-5'-il) *N*-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]-aminocarbonylmethyl phosphonate in high concentration (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inhibited *in vitro* the growth of laboratory sensitive strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Keywords: nucleosides, α -thymidine, phosphonates, synthesis, cytotoxicity, stability, tuberculosis, mycobacteria, antimycobacterial activity, *Mycobacterium tuberculosis*