



УДК 577.113.33

© 1992 г.

*Н. В. Дяткина, М. В. Ясько, А. А. Арзуманов,
А. А. Краевский, Ф. М. Семченко*, О. Г. Еремин*,
Б. И. Мартынов**

**СИНТЕЗ 5'-ФТОРАЛКИЛФОСФОНАТОВ
НУКЛЕОЗИДОВ — СОЕДИНЕНИЙ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ
ПРОТИВОВИРУСНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва;
* Государственный союзный НИИ органической химии и технологии, Москва*

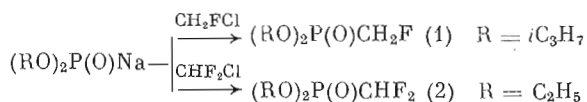
Осуществлен синтез серии 5'-фторалкилфосфонатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 3'-дезоксид-2',3'-дидегидротимидина как соединений с возможными антивирусными свойствами. В качестве фосфонилирующего компонента использовались фторметилфосфоновая, дифторметилфосфоновая, фторхлорметилфосфоновая и винилфосфоновая кислоты. Конденсацию осуществляли либо с N,N'-дциклогексилкарбодимидом, либо с триизопропилбензолсульфохлоридом.

Недавно было установлено, что 5'-Н-фосфонаты 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов обладают активностью против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [1]. Как известно, 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT), разрешенный к применению в клинике препарат против СПИДа, обладает значительной токсичностью. 5'-Н-Фосфонат AZT проявляет противовирусную активность, близкую к исходному нуклеозиду, при более низкой токсичности. Было высказано предположение, что 5'-Н-фосфонат AZT способен проникать через клеточные стенки, а затем или окисляться в соответствующий монофосфат, или превращаться при катализе нуклеотидкиназами в 5'-(β,γ -дифосфорил)- α -Н-фосфонат AZT, который ингибирует синтез провирусной ДНК, катализируемый обратной транскриптазой ВИЧ. Были определены концентрации 5'-Н-фосфоната AZT (ED_{50} — подавляющая на 50% репродукцию вируса, CD_{50} — убивающая на 50% клетки) и их соотношение — индекс селективности (SI). Эти значения составили по данным публикации [2]: ED_{50} 0,03 мкМ, CD_{50} 102 мкМ, SI 3400 (для AZT соответственно 0,06, 72 и 1200), а по данным работы [3]: ED_{50} 0,072, CD_{50} 2500 и SI 34700 (для AZT соответственно 0,005, 154 и 30800).

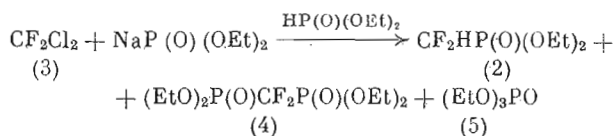
Приведенные характеристики позволяют рассматривать фосфонаты нуклеозидов как соединения с потенциальной активностью против ВИЧ. Интерес в этом ряду представляют фторметил- и дифторметилфосфонаты. В последнее время подобные фосфонаты предложены в качестве близких изоэлектронных и изостерических аналогов фосфатов. В частности, был описан синтез 5'-дифторметилфосфоната тимидина [4], однако его противовирусная активность не изучалась. В настоящей работе представлен синтез нескольких 5'-фторалкилфосфонатов AZT и 3'-дезоксид-2',3'-дидегидротимидина (D4T), а также 5'-винилфосфонатов этих нуклеозидов. Винилфосфонаты были выбраны как иной тип фосфонатов — не содержащих фтора, но несущих электронакцепторную группу. Выбор AZT и D4T определялся их высокой активностью в подавлении репродукции ВИЧ [1], а также данными о том, что их 5'-трифосфаты являются эффектив-

ными терминаторными субстратами ДНК-полимеразы ВИЧ в бесклеточной системе [5, 6].

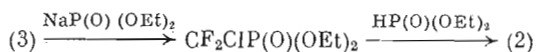
Трудности синтеза фосфонатов нуклеозидов сопряжены главным образом с малой доступностью в препаративных количествах моно- и дифторметилфосфоновых кислот. До настоящего времени для получения таких кислот использовали фторхлор- и дифторхлорметаны [7, 8]:



Нами показано, что взаимодействие дифтордихлорметана (3) с Na-солью диэтилфосфита в присутствии диэтилфосфита также приводит к образованию дифторметилфосфоната (2) и побочных продуктов — тетраэтилового эфира дифторметилбисфосфоновой кислоты (4) и триэтилфосфата (5).

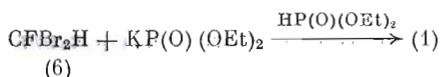


Видимо, данная реакция протекает в несколько стадий с образованием дифторхлорметилфосфоната и его восстановлением избытком диэтилфосфита:

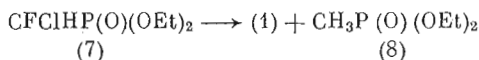


Ранее аналогичное восстановление было отмечено для бромдифторметилфосфоната [9].

Интересно, что во всех известных до настоящего времени случаях наблюдалось восстановление лишь одного атома хлора или брома пергаллоидированного остатка. Нами показано, что при использовании дибромфторметана (6) процесс протекает глубже и приводит к сложной реакционной смеси, содержащей около 10% фторметилфосфоната (1):

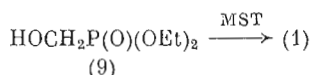


Гораздо более эффективным оказалось восстановление фторхлорметилфосфоната (7) [10] Zn-Cu-парой в водно-спиртовой среде, которое приводит к смеси монофторметилфосфоната (1) (64%) и метилфосфоната (8).



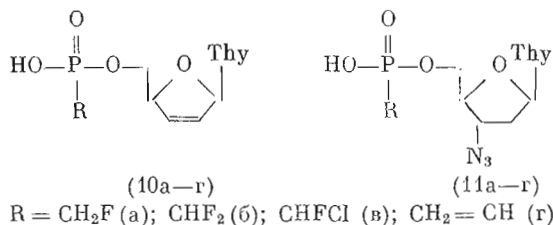
Разделение смеси осуществляли с помощью высокоэффективной ректификации и контролировали ГЖХ.

Нами также был проведен синтез монофторметилфосфоната (1) замещением гидроксила диэтилового эфира гидроксиметилфосфоновой кислоты (9) атомом фтора при действии морфолинотрифторида серы (MST) в дихлорэтане:



Полученные диэтиловые эфиры (1), (2), (7), а также винилфосфонат [11] под действием $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ были превращены в диметилсилиловые эфиры соответствующих фосфоновых кислот, которые после дополнительной очистки перегонкой подвергались гидролизу смесью водного пиридина и

три-*n*-бутиламина и в виде три-*n*-бутиламмониевых солей вводились в конденсацию с нуклеозидами D4Т и AZT. Реакцию проводили в пиридине, в качестве конденсирующего агента использовали триизопропилбензолсульфохлорид (TPS-Cl) или *N,N'*-дициклогексилкарбодимид. Были получены 5'-фосфонаты D4Т (10а-г) и AZT (11а-г):



Полученные фосфонаты выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-Toyorearl в линейном градиенте аммоний-гидрокарбонатного буфера. Дополнительную очистку производили с помощью обращенно-фазовой хроматографии на силикагеле Lichroprep C-18. Полученные фосфонаты имели характерные для тимидиновых производных УФ-спектры, были гомогенны по ТСХ и ВЭЖХ-анализу. В условиях ионообменной хроматографии фосфонаты (10а-г) и (11а-г) имели одинаковое время удерживания, близкое к 7,5 мин, что свидетельствует об одинаковом заряде на фосфонатном остатке в этих соединениях. Структура 5'-фосфонатов (10а-г) и (11а-г) подтверждена данными спектров ЯМР ¹H и ³¹P. Противовирусные свойства испытываются в настоящее время.

Экспериментальная часть

AZT был синтезирован согласно работе [12], D4Т — как описано в работе [6]. Диэтиловый эфир винилфосфоновой кислоты был получен по методике [11], диэтиловый эфир фторхлорметилфосфоновой кислоты — по методике [7], диэтиловый эфир гидроксиметилфосфоновой кислоты — по методике [13].

ТСХ проводили в системе хлороформ — метанол, 9 : 1 (А) и изопропанол — NH₄OH — вода, 7 : 1 : 3 (В). ВЭЖХ осуществляли на колонке Nucleosil NH₂ (7 мкм, Macherey Nagel, ФРГ, 46×250 мм). Для эволюции использовали линейный градиент концентрации KH₂PO₄ (0,05—0,6 М в течение 30 мин, скорость потока 1 мл/мин). ГЖХ этиловых эфиров фосфоновых кислот проводили на хроматографе ЛХМ-8МД (СССР) в следующих условиях: катарометр, колонка 3000×3 мм (Chromaton N-AW-DMCS, 0,160—0,200 мм; 10% Silicone DC-500), газ-носитель — гелий. Ионообменную хроматографию проводили на смоле DEAE-Toyorearl (Toyosoda, Япония), а обращенно-фазовую хроматографию — на силикагеле Lichroprep C-18, 25—40 мкм (Merck, ФРГ).

Спектры ¹H-ЯМР фосфоновых кислот регистрировали на спектрометре EM-390 с рабочей частотой 90 МГц и (CH₃)₄Si в качестве внутреннего стандарта, спектры ¹⁹F-ЯМР — на том же приборе с рабочей частотой 84,67 МГц относительно CFC1₃ как внешнего стандарта, спектры ³¹P-ЯМР — на приборе HA-100D с рабочей частотой 40,5 МГц относительно 85% H₃PO₄ как внешнего стандарта.

Спектры ¹H-ЯМР фосфонатов нуклеозидов регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (100 МГц) в D₂O с использованием *трет*-бутилового спирта как внутреннего стандарта. Спектры ³¹P-ЯМР фосфонатов регистрировали на спектрометре Varian XL-100, в качестве внешнего стандарта использовали 85% H₃PO₄. Все ³¹P-ЯМР спектры регистрировали с полным подавлением протонов.

Диэтиловый эфир фторметилфосфоновой кислоты (1). А) К суспензии калиевой соли диэтилфосфита, полученной растворением 39 г металлического калия и 207 г диэтилфосфита в 400 мл безводного толуола при температуре ниже 35°С, при энергичном перемешивании и охлаждении до 0–5°С добавляли по каплям дибромфторметан (6) (230 г, 1,2 моль). Реакционную массу перемешивали 8 ч и выливали в 800 мл воды. Органический слой отделяли, водный экстрагировали толуолом (150 мл×2). Объединенные органические экстракты сушили MgSO₄ и перегоняли при 8 мм рт. ст., собирая фракцию с т. кип. 85–100°С. Полученную фракцию ректифицировали на колонке, 90 теоретических тарелок (Fischer, ФРГ), отбирая фракцию с т. кип. 96,0–97,0°С (25 мм рт. ст.). Выход 17 г, 10%; n_D^{20} 1,4063. Данные спектров ЯМР соответствующим приведенным в работе [13]. Найдено, %: С 35,45; Н 7,11; F 10,81; Р 18,30. C₅H₁₂FO₃P. Вычислено, %: С 35,29; Н 7,06; F 11,18; Р 18,24.

Б) Раствор диэтилового эфира фторхлорметилфосфоновой кислоты (7) (24,5 г, 0,12 моль) в 60 мл 80% водного спирта смешивали с 15 г свежеприготовленной Zn–Cu-пары. Смесь энергично встряхивали в течение 6 ч, затем фильтровали. Фильтрат упаривали и повторяли процедуру восстановления. После повторного восстановления смесь разделяли высокоэффективной ректификацией. Фракция, собранная при 76,0–76,5°С (20 мм рт. ст.), является диэтиловым эфиром метилфосфоновой кислоты (8), идентичной по своим хроматографическим и спектральным свойствам образцу, полученному ранее по методике [13]. При 92,0–92,5°С (20 мм рт. ст.) отбирали фракцию, содержащую фторметилфосфонат (1), идентичный полученному по приведенной выше методике. Выход 64%.

В) К раствору диэтилового эфира гидроксиметилфосфоновой кислоты (9) (2,3 мл, 10 ммоль) в 10 мл сухого C₂H₄Cl₂ по каплям при перемешивании и охлаждении до 0°С прибавляли MST (2,6 г, 15 ммоль) и перемешивали в течение ночи при 20°С. К реакционной смеси добавляли 5 мл насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой отделяли, водный экстрагировали хлороформом (3×20 мл). Объединенные экстракты сушили Na₂SO₄, упаривали. Разделяли хроматографией на колонке с силикагелем (3×25 см) в хлороформе. Выход фосфоната (1), идентичного полученному ранее 1,16 г (68%).

Диэтиловый эфир дифторметилфосфоновой кислоты (2). К суспензии сухого этилата натрия (68 г, 1,0 моль) в 250 мл безводного эфира при перемешивании и охлаждении до 5°С добавляли по каплям диэтилфосфит (207 г, 1,5 моль). Через полученную смесь барботировали дифтордихлорметан (3) до поглощения 182 г (1,5 моль). Через 8 ч реакционную смесь выливали в 500 мл воды. Органический слой отделяли, водный экстрагировали эфиром (2×100 мл). Объединенные экстракты сушили MgSO₄, упаривали, остаток перегоняли в вакууме, собирая две фракции: фракцию I–73–100°С (10 мм рт. ст.) и фракцию II–130–135°С (2 мм рт. ст.).

Фракцию I ректифицировали, собирая фосфонат (2) при 92,0–92,5°С (25 мм рт. ст.). Выход 52,6 г (28%). n_D^{20} 1,3878; d_4^{20} 1,2423, ЯМР-спектр идентичен приведенному в работе [7]. Найдено, %: С 32,10; Н 5,90; F 20,02; Р 16,53. C₅H₁₁F₂O₃P. Вычислено, %: С 31,91; Н 5,85; F 20,21; Р 16,49.

Фракция II является тетраэтиловым эфиром дифторметилбисфосфоновой кислоты (4). Выход 16,2 г (10%). n_D^{20} 1,4250. ЯМР, м. д.: δ_F 122 (т, ²J_{F,F} 84 Гц), δ_P 4,1 (т, ²J_{P,F} 84 Гц).

При 98–99°С (25 мм рт. ст.) отбирают фракции, содержащие триэтилфосфат (5), идентичный по ГЖХ коммерческому образцу (Мегск, ФРГ). Выход 54 г (31%).

Дисилиловые эфиры фосфоновых кислот. Диэтиловые эфиры фторал-

Физико-химические характеристики дидиловых эфиров фторалкилфосфоновых кислот

Исходный фосфонат	Соединение	Т. кип., °С (мм рт. ст.)	n_D^{20}	^{31}P -ЯМР	^{19}F -ЯМР
				δ, м.д.	
(7)	$\text{FClHCP(O)(OSi(CH}_3)_3)_2$	112–114 (10)	1,4147	–6,9д	169дд
(1)	$\text{FH}_2\text{CP(O)(OSi(CH}_3)_3)_2$	101–102 (12)		–1,3д	
(2)	$\text{F}_2\text{HCP(O)(OSi(CH}_3)_3)_2$	97–98 (12)	1,4005	–11,5т	149дд
Винилфосфонат	$\text{CH}_2=\text{CHP(O)(OSi(CH}_3)_3)_2$	57–60 10	1,4220	0	

Таблица 2

 ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектры фосфонатов нуклеозидов (10) и (11) (δ, м. д. J, Гц)

Соединение	H-1' ($J_{1'2'}$)	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'a, b	R	
						($J_{\text{P, H}}$, H)	($J_{\text{P, F}}$)
(10а)	6,88– 6,98м	6,38– 6,52м	5,88– 6,02м	5,00– 5,16м	4,05– 4,17м	4,56дд (4; 48)	12,96д (58)
(10б)	6,92– 7,04м	6,43– 6,57м	5,95– 6,07м	5,05– 5,24м	4,15– 4,30м	5,87дт (22; 47)	–6,3т (81)
(10в)	6,86– 6,94м	6,40– 6,54м	5,90– 6,04м	5,00– 5,16м	4,06– 4,26м	6,25дд (6; 46)	14,59д (70)
(10г)	6,85– 6,95м	6,41– 6,55м	5,89– 6,02м	5,01– 5,17м	3,93– 4,07м	5,53– 6,03м	8,25с
(11а)	6,22т (6)	2,36– 2,52м	4,43– 4,59м	4,09–4,25м		4,60дд (5; 48)	12,96д (58)
(11б)	6,23т (6)	2,39– 2,55м	4,47– 4,63м	4,03–4,19м		5,88дт (21; 48)	–6,3т (81)
(11в)	6,19т (6)	2,50т	4,41– 4,57м	4,14–4,34м		6,35дд (9; 46)	14,59д (70)
(11г)	6,22т (6)	2,51т	4,39– 4,55м	3,96–4,20м		5,63– 6,16м	8,25с

килфосфоновых кислот (1, 2, 7) и винилфосфоновой кислоты [11] (0,05 моль) смешивали с триметилбромсиланом (18,4 г, 0,12 моль), перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем кипятили 3 ч, охлаждали и упаривали. Остаток перегоняли. Характеристики полученных соединений приведены в табл. 1.

5'-Фосфонаты D4T (10а–г) и AZT (11а, б, г). Дидиловый эфир фосфоновой кислоты (1 ммоль) растворяли в смеси 75% водного пиридина и три-*n*-бутиламина (1 ммоль), перемешивали 5 мин и упаривали. Остаток растворяли в 2 мл пиридина и упаривали, операцию повторяли еще 3 раза. К остатку добавляли раствор 0,5 ммоль нуклеозида AZT или D4T в 15 мл сухого пиридина и 1,5 ммоль TPS-Cl. Контроль за протеканием реакции осуществляли с помощью ТСХ в системе А по исчезновению нуклеозида. Время реакции составило 30 мин для (10а, б, г), 20 мин для (11а, б, г) и 10 ч для (10в). Затем реакционную смесь разбавляли водой.

до объема 150 мл и наносили на колонку с DEAE-Toyopearl (3×25 см). Колонку промывали водой до исчезновения УФ-поглощения элюата; элюцию вели раствором NH_4HCO_3 (линейный градиент концентрации NH_4HCO_3 (рН 7,5) от 0 до 0,2 М). Общий объем 600 мл. Фракции, содержащие фосфонаты нуклеозидов, упаривали и дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией низкого давления на колонке (1×15 см) с силикагелем Lichroprep C-18 в воде. Выход составил 60% для фосфонатов (11а, б, г), 52% для (10а, б), 34% для (10в) и 78% для (10г). Все полученные соединения были гомогенны по ТСХ (R_f 0,70 в системе В) и ВЭЖХ. УФ (H_2O ; рН 7,5): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. Данные ЯМР приведены в табл. 2.

5'-Фторхлорметилфосфонат AZT (11в). К раствору AZT (124 мг, 0,5 ммоль) в 15 мл пиридина добавляли три-*n*-бутиламмониевую соль фторхлорметилфосфоновой кислоты, полученную из 1,5 ммоль диметилэфира фторхлорфосфоновой кислоты по описанной выше методике, и DCC (309 мг, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, добавляли 13 мл воды и выдерживали 3 ч. Реакционную смесь фильтровали, осадок промывали водой. Фильтрат разбавляли водой до объема 150 мл. Фосфонат (11в) выделяли и очищали по приведенной выше методике. Получили 140 мг аммониевой соли (выход 57%). R_f 0,70 (В). УФ (H_2O , рН 7): $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм. Данные ЯМР приведены в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарусова Н. Б., Хорлин А. А., Краевский А. А., Корнеева М. Н., Носик Д. Н., Круглов И. В., Галегов Г. А., Вибилашвили Р. Ш. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716–1724.
2. Карамов Э. В., Лукашев В. В., Тарусова Н. Б., Корнилова Г. В., Розова М. А., Галегов Г. А., Кузанова М. К., Краевский А. А. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 6. С. 1695–1701.
3. Zhu Q.-Y., Watanabe K., Kravetsky A. A., Tarusova N. B., Polsky B. W., Gold J. W. M., Baron P., Haroly W., Armstrong D., Chou T.-C. // VI International Conference on AIDS, San Francisco. 1990. Abstracts. V. 1. P. 187. (270).
4. Don Bergstrom, Romo E., Shum P. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1–2. P. 53–63.
5. 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. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 20. P. 7096–7100.
6. Mansuri M., Starrett J. E., Chazzouli J., Hitchcock J. M., Sterzycki R. Z., Brankovan V., Lin T.-S., August M., Prusoff W., Sommadossi J.-P., Martin J. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. № 2. P. 461–466.
7. Blackburn M., Parratt M. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1986. № 8. P. 1425–1430.
8. Blackburn M., Brown D., Martin St., Parratt M. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1987. № 1. P. 181–186.
9. Obayashi M., Ito E., Matsui K., Kondo K. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 22. P. 2323–2324.
10. Burton D., Flynn R. // J. Fluorine Chem. 1980. № 15. P. 263–266.
11. Кабачник М. И., Медведь Т. Я. // Изв. АН СССР. 1959. № 12. С. 2142–2146.
12. Зайцева В. Е., Дякина Н. В., Краевский А. А., Скапцова Н. В., Турина О. В., Гнучев Н. В., Готтлик Б. П., Ажаев А. В. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 670–680.
13. Holy A., Rosenberg I. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1982. V. 47. P. 3447–3463.

Поступила в редакцию
8.IV.1991

После доработки
6.VI.1991

N. B. DYATKINA, M. V. JASKO, A. A. ARZUMANOV, A. A. KRAYEVSKY,
F. M. SEMCHENKO*, O. G. YEREMIN*, B. I. MARTYNOV*

**SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE 5'-FLUOROALKYLPHOSPHONATES WITH
POTENTIAL ANTIVIRAL ACTIVITY**

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences,
Vavilova 32, Moscow 117984;*
* *Research Institute of General Chemical Technology,
Entusiastov Ave, Moscow*

Several 5'-fluoroalkylphosphonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine were synthesized as potential antiviral compounds. Fluoromethyl, difluoromethyl, fluorochloromethyl and vinyl phosphonates were used as phosphonylating components, with dicyclohexylcarbodiimide or triisopropylbenzenesulphonyl chloride as condensing reagents.