



УДК 577.113.3:547.854.4'455.562.057

© 1994 М. В. Ясько, Н. А. Новиков *,
Н. Б. Тарусова

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕЗА 5'-О-ФОСФОНОМЕТИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва;
НИИ синтетических и натуральных душистых веществ, Москва

Ключевые слова: нуклеозиды, нуклеотиды, аналоги.

В результате алкилирования натриевых производных нуклеозидов пиримидинового и пуринового рядов и их аналогов *n*-толуолсульфонилэксиметилфосфоновой кислотой или ее моноэтиловым эфиром получены соответствующие 5'-О-фосфонометильные производные. Алкилирование предложенными реагентами позволяет провести синтез фосфонометильных производных достаточно селективно по 5'-О-алифатическому гидроксилу. При использовании *n*-толуолсульфонилэксиметилфосфоновой кислоты показана возможность одностадийного синтеза 5'-О-фосфонометильных производных нуклеозидов.

Способность ряда О-фосфонометильных производных аналогов нуклеозидов подавлять репродукцию вирусов стимулировала интерес исследователей к синтезу и изучению антивирусных свойств большого числа соединений такого рода [1, 2]. О-Фосфонометильные производные нуклеозидов, рассматриваемые как аналоги фосфатов нуклеозидов, и их полифосфорилированные формы, моделирующие структуры нуклеозид-5'-трифосфатов, представляют интерес также для исследования механизмов подавления репродукции вирусов. Эти соединения, содержащие не гидролизуемую ферментами связь между углеводным фрагментом нуклеозидов и фосфорсодержащими остатками, могут использоваться для изучения ферментов репродукции вирусов и ферментов метаболизма клеток, катализирующих превращение нуклеозидов, их фосфатов и олигофосфатов в процессе биосинтеза нуклеиновых кислот.

Синтез 5'-О-фосфонометильных производных нуклеозидов обычно осуществляется по методу, разработанному А. Холи [2], заключающемуся во взаимодействии соединения, содержащего спиртовый гидроксил (нуклеозид или аналога), защищенного по основанию в случае пуриновых производных, с диэфиром *n*-толуолсульфонилэксиметилфосфоновой кислоты в присутствии гидрида натрия. Условия такого синтеза, включая саму конденсацию и последующие стадии деблокирования, ограничивают возможности метода по отношению к соединениям, нестабильным в условиях гидролиза, например к пуриновым нуклеозидам 2'-деокси- и 2',3'-дидезоксириада.

В недавно опубликованной работе [3] показано, что перспективным для получения О-фосфонометильных производных нуклеозидов может быть использо-

Схема 1

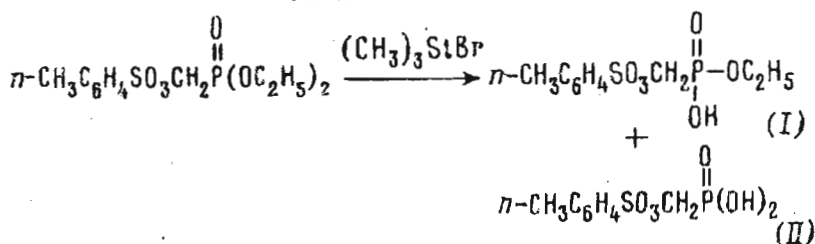
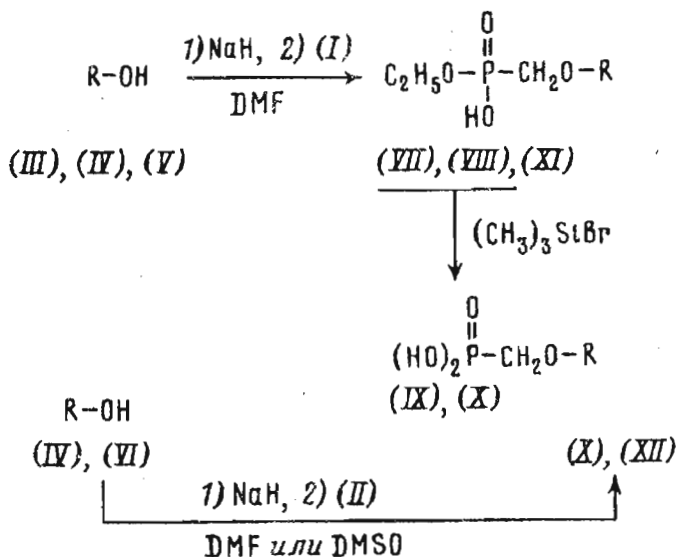
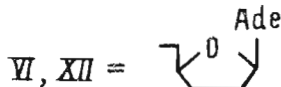
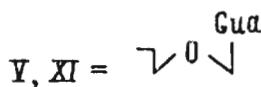
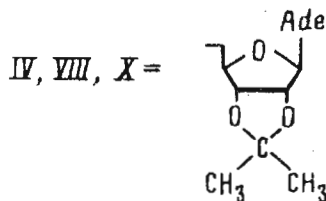
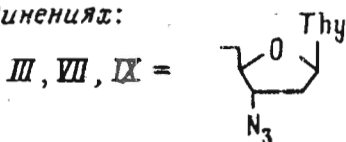


Схема 2



R в соединениях:



вание диэтилового эфира трифторметансульфонилоксиметилфосфоновой кислоты.

В процессе работы по синтезу различных 5'-фосфорных производных нуклеозидов и их аналогов, в том числе и 5'-О-фосфонометильных производных, были выявлены возможности упрощения процедуры синтеза этих производных и при этом повышения селективности реакции фосфонометилирования. Одна из возможностей достижения избирательности алкилирования — синтез 5'-О-фосфонометильных производных 2'-дезоксинуклеозидов, в котором используется внутримолекулярная реакция 3'-О-йодметилфосфоната с 5'-гидроксидом в присутствии основания [4]. Нами были исследованы также возможности

алкилирования нуклеозидов с использованием NaN *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислотой с частично этерифицированной (I) или полностью не защищенной фосфонильной группой (II) (полученных по схеме 1). В качестве модельных нуклеозидов были использованы 3'-азидо-3'-дезокситимидин (III), 5'-О-фосфонометильное производное которого было синтезировано ранее [1, 5], 2',3'-О-изопропилиденаденозин (IV), ациклогуанозин (V) и 2',3'-дидезоксиаденозин (VI) (схема 2). В случае 3'-азидо-3'-дезокситимидина (III) суммарный выход фосфонометильного производного (IX) превышает выход того же соединения, полученного по методике [1] (соответственно 25 и 14%).

Предлагаемый способ синтеза удобен тем, что образующиеся при реакции с соединениями (I) и (II) продукты (VII) — (XII), содержащие заряженную фосфонильную группу, существенно отличаются от соответствующих исходных нуклеозидов (III) — (VI) по хроматографической подвижности. Это позволяет легко контролировать ход реакции, а также выделять вещества из реакционной массы при помощи ионообменной хроматографии.

В качестве растворителя для реакций использовался DMF. В случае соединений с низкой растворимостью в DMF допустимо использование DMSO (показано на примере реакции фосфоновой кислоты (II) и нуклеозида (IV)).

Реакции с участием реагентов (I) и (II) протекали быстрее, чем соответствующие реакции с использованием полностью этерифицированной *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты. В случае соединения (III) не отмечалось образование примесей продукта, алкилированного по 3-N основания, в то время как при проведении синтеза по методу А. Холи такого рода примеси обнаружены [1], а для пуриновых производных обязательна защита основания [6]. При фосфонометилировании адениновых нуклеозидов (IV) и (VI) не отмечено образование значительных количеств продуктов алкилирования основания, особенно при использовании моноэфира (I) и DMF в качестве растворителя. Это существенно расширяет возможности синтеза О-фосфонометильных производных нуклеозидов и их аналогов, в частности производных аденина. Синтез с использованием ациклогуанозина (V) показывает, что и для гуаниновых производных использование реагента (I) также дает достаточно удовлетворительные результаты.

Эффект увеличения избирательности реакции может быть связан с влиянием анионного кислорода при фосфоре, способного изменять электронную плотность на метиленовой группе.

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ЯМР- и масс-спектрометрии. УФ-спектры полученных соединений не отличались от соответствующих спектров исходных нуклеозидов (данные не приводятся). ^1H -ЯМР-спектры соединений (X), (XII) содержали характерные дублеты с $J_{\text{CH}_2\text{P}}$ 8,5 Гц, ^{31}P -ЯМР-спектры соединений (X), (XII) представляли собой триплеты с той же константой, в ^{13}C -ЯМР-спектрах этих соединений наблюдались дублеты с $^1J_{(\text{C,P})}$ 155—157 (δ 72,7 и 69,2 м. д.), что коррелирует с данными [1, 6]. Характеристики производного (IX) совпадают с данными для образца, синтезированного ранее [5]. Гомогенность полученных соединений контролировалась с помощью ТСХ на силикагеле, а также на основании данных ЯМР-спектрометрии.

Экспериментальная часть

Диэтиловый эфир *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты был получен по методике [6]. Использовались DEAE-целлюлоза DE-32 фирмы Whatman (в HCO_3^- -форме), LiChroprep RP-18 (25—40 мкм, Merck), триметилбромсилан и 80% суспензия NaN в минеральном масле фирмы Fluka.

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе Varian XL-100-15 (США) с рабочей частотой 100 МГц (внутренний стандарт — *трет*-бутанол), ^{13}C -ЯМР-спектры (62,89 МГц, с подавлением расщепления на протонах, внутренний стандарт — 1,4-диоксан) и ^{31}P -ЯМР-спектры (101,27 МГц, без подавления расщепления на прото-

нах, внешний стандарт — 85% фосфорная кислота) сняты на приборе Bruker WM-250 (США), во всех случаях в качестве растворителя использовалась D₂O. FAB-Масс-спектрометрия выполнена на спектрометре Kratos MS 50TC (США), образцы смешивались с глициерином.

*Моноэтиловый эфир *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты (I) и *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновая кислота (II).* К 645 мг (2 ммоль) диэтилового эфира *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты прибавляли при 5°C 0,4 мл (3 ммоль) триметилбромсилана. Через 12 ч раствор упаривали, переупаривали с толуолом (2×10 мл), остаток растворяли в 10 мл 5% водного аммиака, упаривали, растворяли в 200 мл воды и наносили на колонку с DE-32 (4×20 см), промывали 300 мл воды, элюировали в линейном градиенте концентрации гидрокарбоната аммония (0 → 0,15 М). УФ-поглощающие фракции упаривали и соупаривали с водой и спиртом. Выход 441 мг (75%) (I) и 42 мг (8%) (II). ¹H-ЯМР-спектр (D₂O; δ, м. д., J, Гц), (I): 7,77 д (2H, J 8, *o*-CH, Ar), 7,41д (2H, *m*-CH, Ar), 4,05д (2H, J_{CH₂P} 9, CH₂P), 3,74 дкв (2H, J 7, CH₂CH₃), 2,42с (3H, Me-Ar), 1,14т (3H, J 7, CH₂CH₃); (II): 7,76д (2H, J 8, *o*-CH, Ar), 7,31д (2H, *m*-CH, Ar), 3,99д (2H, J_{CH₂P} 9, CH₂P), 2,34 с (3H, Me-Ar). Масс-спектр, *m/z*: (M + 1) 295 (I); 267 (II).

*Реакция моноэфира *n*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты (I) с нуклеозидами и аналогами нуклеозидов.* Соупаривали 0,5 ммоль нуклеозида (III) — (V) с абсолютным DMF (3×10 мл), растворяли в 10 мл DMF и прибавляли 3—4 ммоль NaNH, интенсивно перемешивали взвесь 40 мин, затем добавляли 1,5 ммоль фосфоната (I) (предварительно переупаренного с 3 ммоль трибутиламина и 10 мл DMF) в виде раствора в 5 мл DMF. Реакционную массу перемешивали при 20°C 4—5 ч, приливали 8 ммоль уксусной кислоты, разбавляли водой до объема 100 мл и наносили на колонку с DE-32. Колонку промывали водой до исчезновения УФ-поглощения элюата; элюцию проводили раствором NH₄HCO₃ как описано выше. Выход составил (%): 41 (VII), 37 (VIII) и 22 (XI). ¹H-ЯМР-спектр (VII): 7,58кв (1H, J_{6,5-Me} 1, H-6), 6,15т (1H, J_{1',2'} 6,5, H-1'), 4,44м (1H, H-3'), 4,1м (1H, H-4'), 3,93 дкв (2H, J 7, CH₂CH₃), 3,8м (2H, H-5'), 3,76д (2H, J_{CH₂P} 8,5, CH₂P), 2,46м (2H, H-2'), 1,93д (3H, 5-Me), 1,26т (3H, J 7, CH₂CH₃); (VIII): 8,32с (1H, H-8), 8,14с (1H, H-2), 6,17д (1H, J_{1',2'} 2,5, H-1'), 5,37м (1H, H-2'), 5,16м (1H, H-3'), 4,61м (1H, H-4'), 3,91дкв (2H, J 7, CH₂CH₃), 3,78м (2H, H-5'), 3,73д (2H, J_{CH₂P} 9, CH₂P), 1,76с и 1,54с (6H, Me), 1,26т (3H, J 7, CH₂CH₃); (XI): 8,04с (1H, H-8), 5,5с (2H, H-1'), 3,91дкв (2H, J 7, CH₂CH₃), 3,78м (4H, H-3', H-4'), 3,68д (2H, J_{CH₂P} 8,5, CH₂P), 1,26т (3H, J 7, CH₂CH₃). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O; δ, м. д., J, Гц), (VII): 18,1м, J_{P,CH₂} 8,5; (VIII): 18,2м J_{P,CH₂} 8,5; (XI): 18,1м, J_{P,CH₂} 8,5. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1) 390 (VII); 430 (VIII); 334 (XI).

Реакция фосфонатов (VII) и (VIII) с триметилбромсиланом. Соупаривали 0,1 ммоль моноэтиловых эфиров (VII) или (VIII) с DMF (3×5 мл), растворяли в 5 мл DMF и прибавляли при 5°C 0,11 мл (0,8 ммоль) триметилбромсилана. Через 12 ч раствор упаривали, переупаривали с DMF (3×5 мл), остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с DE-32 (3×10 см), колонку промывали водой и элюировали как описано выше. Выход, %: 61 (IX) и 69 (X). ¹H-ЯМР-спектр (X): 8,31с (1H, H-8), 8,1с (1H, H-2), 6,16д (1H, J_{1',2'} 2,5, H-1'), 5,35м (1H, H-2'), 5,18м (1H, H-3'), 4,59м (1H, H-4'), 3,8м (2H, H-5'), 3,64д (2H, J_{CH₂P} 8,5, CH₂P), 1,71с и 1,49с (6H, Me). ³¹P-ЯМР-спектр (X): 16,3т, J_{P,CH₂} 8,5. Данные ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектров идентичны приведенным в работе [5], ¹³C-ЯМР-спектр (IX): 168,8с (C-4), 151,9с (C-2), 137,7с (C-6), 112,0с (C-5), 85,5с (C-1'), 83,2с (C-4'), 72,7д (C-5'), ³J_(C,P) 9,5; 68,0д (C-P, ¹J_(C,P) 157), 61,1с (C-3'), 36,3с (C-2'), 11,9с (CH₃). Масс-спектр, *m/z*: (M + 1) 362 (IX); 402 (X).

Реакция *p*-толуолсульфонилоксиметилфосфоновой кислоты (II) с нуклеозидами. Соупаривали 0,5 ммоль нуклеозида (IV) или (VI) с абсолютным DMF (3×10 мл), растворяли в 10 мл DMF (VI) или DMSO (IV) и прибавляли 4 ммоль NaN, интенсивно перемешивали взвесью 40 мин, затем добавляли 1 ммоль фосфоновой кислоты (II) (предварительно переупаренной с 2 ммоль трибутиламина и 10 мл DMF) в виде раствора в 5 мл DMF (для VI) или DMSO (для IV). Реакционную массу перемешивали при 20°C 6 ч, приливали 6 ммоль уксусной кислоты, разбавляли водой до объема 100 мл и наносили на колонку с DE-32. Колонку промывали водой, элюцию проводили раствором NH_4HCO_3 как описано выше. Дополнительно очищали на колонке (2×20 см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Выход, %: 20 (X) и 26 (XII). ^1H -ЯМР-спектр (XII): 8,25с (1H, H-8), 8,06с (1H, H-2), 6,21дд (1H, J 3; 6, H-1'), 4,39м (1H, H-4'), 3,76м (2H, H-5'), 3,57д (2H, $J_{\text{CH}_2\text{P}}$ 8,5, CH_2P), 1,93—2,75м (4H, H-2', 3'). ^{31}P -ЯМР-спектр (XII): 15,2т, $J_{\text{P,CH}_2}$ 8,5. ^{13}C -ЯМР-спектр (XII): 156,7с (C-6), 153,8с (C-2), 149,6с (C-4), 141,2с (C-8), 120,0с (C-5), 86,4с (C-1'), 82,2с (C-4'), 75,8д (C-5'), $^3J_{(\text{C,P})}$ 10,9; 69,2д (C-P, $^1J_{(\text{C,P})}$ 155,4), 33,0с (C-2'), 27,0с (C-3'). Масс-спектр, m/z : ($M + 1$) 330 (XII).

Таким образом, на примере группы аналогов нуклеозидов, в том числе различных типов пуриновых производных, показано преимущество алкилирования с применением соединений (I) и (II) по сравнению с известным методом синтеза *O*-фосфонометильных производных нуклеозидов и их аналогов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J., Janssen G., Busson R., Hoogmartens J., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 9. P. 2481—2487.
2. Holy A. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1987. V. 6. № 1, 2. P. 147—155.
3. Norbeck D. W., Sham H. L., Rosenbrook W., Herrin T., Plattner J. J. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1992. V. 11. № 7. P. 1383—1391.
4. Ясько М. В., Новиков Н. А., Тарусова Н. Б. // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. № 9. С. 1258—1259.
5. Тарусова Н. Б., Хорлин А. А., Краевский А. А., Корнеева М. Н., Носик Д. Н., Круглов И. В., Галегов Г. А., Библиашвили Р. Ш. // *Молекулярная биология.* 1989. Т. 23. № 6. С. 1716—1724.
6. Holy A., Rosenberg I. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1982. V. 47. P. 3447—3463.

Поступила в редакцию
17.III.1993

После доработки
1.VI. 1993

M. V. Jasko, N. A. Novicov, N. B. Tarusova

A NEW APPROACH TO SYNTHESIS OF 5'-O-PHOSPHONOMETHYL DERIVATIVES OF NUCLEOSIDES AND THEIR ANALOGUES

V. A. Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Alkylation of nucleosides and their analogues with *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonic acid and its monoester allows to simplify the synthesis of the 5'-*O*-phosphonomethyl nucleoside derivatives.