



УДК 577.113.3

## СИНТЕЗ $\beta$ -*H*-ФОСФОНО- $\alpha$ -ФОСФОНОМЕТИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИД-5'-ДИФОСФАТОВ

© 2001 г. А. В. Иванов<sup>#</sup>, М. В. Ясько, Л. А. АлександроваИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 13.11.2000 г. Принята к печати 23.11.2000 г.

Синтезированы новые  $\beta$ -*H*-фосфоно- $\alpha$ -фосфонометильные аналоги нуклеозид-5'-дифосфатов. 5'-*O*-Фосфонометилтимидин и 9-[2-(фосфонометилокси)этил]аденин вступали в реакцию фосфонирования с пирофосфитом натрия. Соединения получены в индивидуальном виде, их структура подтверждена методами ЯМР- и УФ-спектроскопии.

*Ключевые слова:* нуклеозиды; нуклеотиды; аналоги; *H*-фосфонаты.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из важных направлений химии нуклеиновых кислот является синтез аналогов природных нуклеотидов, модифицированных по фосфорному фрагменту, которые широко используются как для изучения ферментов нуклеотидного обмена, так и для создания новых лекарственных препаратов. Для нескольких *H*-фосфонатов известных модифицированных нуклеозидов, проявляющих противовирусную активность, было показано, что они способны в той или иной степени выступать в качестве предшественников аналогов нуклеозид-5'-фосфатов. При этом они отличаются от самих аналогов по метаболизму и стабильности по отношению к действию клеточных дефосфорилирующих ферментов [1, 2]. Такие свойства *H*-фосфонатных аналогов нуклеозидов делают их потенциальными противовирусными агентами [3, 4]. Соответственно представлялось перспективным синтезировать  $\beta$ -*H*-фосфонатные аналоги нуклеозид-5'-дифосфатов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов такой модификации были выбраны следующие соединения:

1) 5'-*O*-Фосфонометилтимидин (I) – аналог ТМР;  $\beta$ , $\gamma$ -дифосфат этого аналога демонстрировал необычную специфичность в ингибировании синтеза ДНК, катализируемого некоторыми ДНК-полимеразами. В частности, такой аналог трифосфата не узнавался человеческими ДНК-полимеразами  $\epsilon$  и  $\beta$ , фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, а также обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека, но проявлял

субстратные свойства по отношению к человеческим ДНК-полимеразам  $\alpha$  и  $\delta$  (к последней только в присутствии ядерного антигена пролиферирующих клеток) [5, 6], а также к ДНК-полимеразе вируса герпеса простого типа 1 [7]. В то же время 5'-*O*-фосфонометилтимидин плохо фосфорилируется в культуре клеток [8].

2) 9-[2-(Фосфонометилокси)этил]аденин (PMEA, II) – известный ациклический нуклеотидный аналог с широким спектром противовирусного действия [9–11] и при этом с достаточно низким уровнем ферментативного превращения в соответствующий аналог 5'-трифосфата [11–13].

Ранее в литературе были описаны  $\beta$ - и  $\gamma$ -*H*-фосфонатные аналоги 5'-ди- и трифосфатов природных нуклеозидов [14, 15]. Однако продукты реакции не выделялись, а их присутствие в реакционной смеси фиксировалось с помощью аналитической ВЭЖХ и ЯМР-спектроскопии. Мы впервые получили нуклеотидподобные структуры, содержащие ангидридную связь между *H*-фосфонатным и фосфонометильным фрагментами, и разработали простую методику выделения этих соединений.

Присоединение *H*-фосфонатного фрагмента проводили взаимодействием пирофосфита натрия с фосфонатом нуклеозидов (схема) по аналогии с методом [15], предложенным для получения 5'- $\beta$ -*H*-фосфоно- $\alpha$ -фосфатов нуклеозидов. В процессе реакции рН реакционной смеси находился в пределах от 6 до 7. Фосфоангидридная связь в соединениях (III) и (IV) лабильна в щелочной среде, поэтому невозможно анализировать реакционную смесь методом ТСХ на силикагеле, используя стандартные системы, содержащие водный аммиак или триэтиламин. По той же причине оказалось затруднительным применение ионообменной хроматографии для разделения реакци-

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; факс: (095) 135-14-05; e-mail: aivanov@yandex.ru).

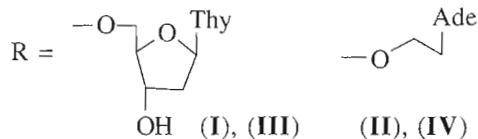
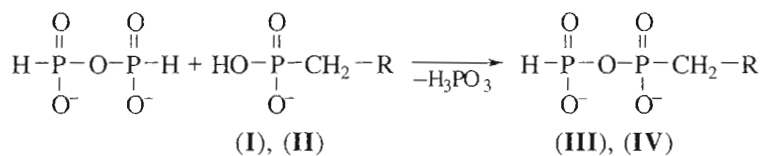


Схема.

онной смеси. Для наблюдения за прохождением реакции с помощью ТСХ использовали системы: 1-бутанол–вода–уксусная кислота, 5 : 3 : 2 и 1,4-диоксан–вода–уксусная кислота, 8 : 2 : 0.2.

Выделение продуктов проводили хроматографией на силикагеле с обращенной фазой LiChroprep RP-18, элюировали водой. Побочные продукты зафиксированы не были, хотя согласно работе [15] при pH > 6 могут образовываться соединения, содержащие Н-фосфонатный остаток в 3'-положении (δ<sub>p</sub> 7.1 м.д., J<sub>p, H</sub> 650 Гц). Полученные аналоги (III) и (IV) имеют характерные сигналы в <sup>31</sup>P-ЯМР-спектре: дублет триплетов для атома P<sup>α</sup> с константой спин-спинового взаимодействия J 23 Гц (P<sup>α</sup>–P<sup>β</sup>-взаимодействие) и J 8 Гц (P–CH<sub>2</sub>-взаимодействие), а также дублет дублетов для атома P<sup>β</sup> с J 662–663 Гц (P–H-взаимодействие) и J 23 Гц (P<sup>β</sup>–P<sup>α</sup>-взаимодействие). Низкий выход реакции связан с недостаточной конверсией исходных фосфонатов. Полученные соединения охарактеризованы также методами УФ- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии.

Биохимические свойства соединений (III) и (IV) будут описаны позднее.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пирофосфит натрия синтезирован по методу [14], фосфонаты (I) и (II) как описано в работах [7] и [16] соответственно. Для разделения продуктов реакции использовали колонку (2.2 × 28 см) LiChroprep RP-18 (25–40 мкм, Merck).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Spereord M40 (Германия) в воде, спектры ЯМР на спектрометре АМХ III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для <sup>1</sup>H (внутренний стандарт – трет-бутанол) и 162 МГц для <sup>31</sup>P (без подавления расщепления на протонах, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота), в качестве растворителя использовали D<sub>2</sub>O.

**5'-O-(β-Н-Фосфоно-α-фосфонометил)тимидин (III).** К раствору 25 мг (0.07 ммоль) фосфоната (I) в 0.8 мл воды добавляли 200 мг (1.1 ммоль) пиро-

фосфита натрия, после чего реакционную смесь выдерживали при 60°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали и хроматографировали на колонке с RP-18, элюировали водой. УФ-поглощающие фракции упаривали в вакууме, растворяли в 0.8 мл воды и повторно хроматографировали в аналогичных условиях, первые УФ-поглощающие фракции лиофильно высушивали. Выход 6 мг (21%). УФ (H<sub>2</sub>O, pH 7): λ<sub>макс</sub> 267 нм. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.; J, Гц): 7.49 с (1H, H6), 6.81 д (1H, <sup>1</sup>J<sub>H, P</sub> 662, H-P), 6.18 т (1H, J<sub>1,2</sub> 6.9, H1'), 4.42 м (1H, H3'), 3.98 м (1H, H4'), 3.74–3.59 м (4H, H5' и CH<sub>2</sub>P), 2.31–2.19 м (2H, H2'), 1.77 с (3H, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр (δ, м. д.; J, Гц): 9.38 дт (1P, J<sub>Pα, Pβ</sub> 23, J<sub>P, CH<sub>2</sub></sub> 8, P<sup>α</sup>), –5.52 дд (1P, J<sub>P, H</sub> 662, J<sub>Pα, Pβ</sub> 23, P<sup>β</sup>).

**9-[2-(β-Н-Фосфоно-α-фосфонометил)окси]этил]аденин (IV).** К раствору 27 мг (0.1 ммоль) фосфоната (II) в 1 мл воды добавляли 270 мг (1.48 ммоль) пирофосфита натрия, после чего реакционную смесь выдерживали при 60°C в течение 2.5 ч. Продукт выделяли как описано выше для соединения (III). Выход 8 мг (24%). УФ (H<sub>2</sub>O, pH 7): λ<sub>макс</sub> 263 нм. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр: 8.20 с и 8.19 с (2H, H8 и H2), 6.81 д (1H, <sup>1</sup>J<sub>H, P</sub> 663, H-P), 4.41 т (2H, J 5, CH<sub>2</sub>-Ade), 3.96 т (2H, J 5, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.71 д (2H, <sup>2</sup>J<sub>H, P</sub> 8, CH<sub>2</sub>P). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр: 9.36 дт (1P, J<sub>Pα, Pβ</sub> 23, J<sub>P, CH<sub>2</sub></sub> 8, P<sup>α</sup>), –5.40 дд (1P, J<sub>P, H</sub> 663, J<sub>Pα, Pβ</sub> 23, P<sup>β</sup>).

Работа финансировалась из гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 98-03-32930а.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куханова М.К., Тарусова Н.Б., Ясько М.В., Арзуманов А.А., Гудима С.О., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Библашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1148–1159.
2. Kukhanova M.K., Kuznetsova E.V., Arzumanov A.A., Krayevsky A.A. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 997–1000.

3. Machado J., Salomon H., Oliveira M., Tsoukas C., Krayevsky A.A., Wainberg M.A. // *Nucleosides Nucleotides*. 1999. V. 18. P. 901–906.
4. Галегов Г.А., Шобухов В.М., Леонтьева Н.А., Ясько М.В. // *Биоорг. химия*. 1997. Т. 23. С. 906–909.
5. Jasko M.V., Semizarov D.G., Victorova L.S., Mozzherin D.J., Krayevsky A.A., Kukhanova M.K. // *FEBS Lett*. 1995. V. 357. P. 23–26.
6. Mozzherin D.J., McConnell M., Jasko M.V., Krayevsky A.A., Tan C.-K., Downey K.M., Fisher P.A. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 31711–31717.
7. Куханова М.К., Кузнецова Е.В., Ясько М.В., О'Хара Б., Беккер Дж., Морин Дж., Глузман Я. // *Молекуляр. биология*. 1994. Т. 28. С. 875–886.
8. Ясько М.В., Сидоров Г.В., Кондратов Р.В., Присолов В.С., Мясоедов Н.Ф., Краевский А.А. // *Биоорг. химия*. 1998. Т. 24. С. 21–24.
9. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rozenberg I., Holy A. // *Antiviral Res*. 1987. V. 8. P. 261–272.
10. Balzarini J., Naesens L., Herdewijn P., Rosenberg I., Holy A., Pauwels R., Baba M., Johns D.G., De Clercq E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 332–336.
11. Holy A., Votruba I., Merta A., Cerny J., Vesely J., Vlach J., Sediva K., Rosenberg I., Otmar M., Hrebabecky H., Travnicek M., Vonka V., Snoeck R., De Clercq E. // *Antiviral Res*. 1990. V. 13. P. 295–311.
12. Balzarini J., De Clercq E. // *J. Biol. Chem*. 1991. V. 266. P. 8686–8689.
13. Balzarini J., Hao Z., Herdewijn P., Johns D.G., De Clercq E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 1499–1503.
14. Yamamoto Y., Baba Y., Mizokushi M., Onoe M., Sumiyama T., Tsuchiko M., Yoza N., Ohashi S. // *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1988. V. 61. P. 3217–3223.
15. Baba Y., Sumiyama T., Tsuchiko M., Yoza N. // *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1989. V. 62. P. 1587–1592.
16. Holy A., Rosenberg I. // *Collect. Czech. Chem. Commun*. 1987. V. 52. P. 2801–2809.

## Synthesis of $\beta$ -H-Phosphono- $\alpha$ -phosphonomethyl Analogues of Nucleoside 5'-Diphosphates

A. V. Ivanov, M. V. Jasko, and L. A. Alexandrova

*e-mail: aivanov@yandex.ru*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

Novel  $\beta$ -H-phosphono- $\alpha$ -phosphonomethyl analogues of nucleoside 5'-diphosphates were synthesized by phosphorylation of 5'-O-phosphonomethylthymidine and 9-[2-phosphonomethoxy]ethyladenine with sodium pyrophosphate. The structures of the resulting individual compounds were confirmed by NMR and UV spectroscopy. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words: nucleosides, nucleotides, analogues, H-phosphonates*