

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет



004614512

На правах рукописи

Минаева Лидия Игоревна

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНО
ЗАМЕЩЕННЫХ ФОСФОНАТОВ И АМИДОФОСФАТОВ**

02.00.03 — органическая химия

02.00.08 — химия элементоорганических соединений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

- 2 ДЕК 2010

Москва — 2010

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители: кандидат химических наук,
доцент **Кабачник М. М.**
академик РАН, профессор
Белецкая И. П.

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Козлов Владимир Андреевич
доктор химических наук,
профессор **Коротеев Михаил Петрович**

Ведущая организация: **Российский Химико-технологический**
университет им. Д.И. Менделеева

Защита состоится «8» декабря 2010 г. в 11 часов на заседании
диссертационного совета Д 501.001.69 по химическим наукам при Московском
Государственном Университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119991,
Москва, Ленинские Горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, Химический
факультет, аудитория 446.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического
факультета МГУ.

Автореферат разослан «2» ноября 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор химических наук



Магдесиева Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Фосфорорганические соединения, содержащие связи P-C и P-N, привлекают интерес исследователей в области химии, биохимии и медицины благодаря уникальному набору химических свойств и широкому спектру биологической активности. Ежемесячно выходит множество публикаций, посвященных синтезу и практическому применению замещенных фосфонатов и амидофосфатов. В настоящее время среди этих соединений найдены ингибиторы различных ферментов, лекарственные средства, обладающие антибактериальной, антивирусной и другими видами фармакологической активности.

Разнообразная биологическая активность замещенных фосфонатов и амидофосфатов, хотя и является их наиболее интересным и перспективным свойством, однако далеко не ограничивает область их применения. Эти соединения также могут выступать в качестве эффективных органических катализаторов, инициаторов процессов ионной полимеризации и экстрагентов.

Введение в молекулы замещенных фосфонатов и амидофосфатов фрагментов природного происхождения, таких как аминокислоты, пептиды, сахара, порфирины и хлорины, является способом синтеза лекарственных препаратов различного строения, однако, обычные, зачастую жесткие, условия синтеза таких соединений неприемлемы для природных объектов.

Известно несколько основных методов получения замещенных фосфонатов и амидофосфатов. Все эти методы объединяет то, что они, как правило, проводятся в достаточно жестких условиях (длительное нагревание, проведение реакции в запаянных ампулах) или требуют использования различных катализаторов. Однако, несмотря на разнообразие методов синтеза замещенных фосфонатов и амидофосфатов сложного строения, область их применения зачастую ограничена трудностью их получения.

В последние годы в связи с разработкой новых энергосберегающих и экономичных технологий все больше внимания уделяют использованию в органическом синтезе микроволнового облучения. Это связано с тем, что применение микроволновой активации позволяет не только значительно увеличить скорость изучаемой реакции и повысить выходы целевых соединений, но и свести к минимуму образование побочных продуктов. Кроме того, в некоторых работах отмечено, что использование микроволнового облучения дает возможность уменьшить количество растворителя, а иногда и вовсе отказаться от его применения.

В связи с этим поиск новых эффективных методов синтеза замещенных фосфонатов и амидофосфатов является актуальным.

Цель работы.

Целью настоящей работы является разработка оптимальных методов синтеза замещенных диалкилфосфонатов и амидофосфатов, синтез неизвестных ранее фосфорорганических соединений этих классов, в том числе, содержащих адамантильный и хлориновый фрагменты, а также изучение их биологических активности.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Изучен двухстадийный синтез α -аминофосфонатов со свободной аминогруппой, включающий в себя синтез *N*-замещенных аминофосфонатов алифатического и ароматического рядов в присутствии каталитических количеств CdI_2 при микроволновом содействии в двух- и трехкомпонентной системе, и последующее удаление защиты с атома азота α -аминофосфонатов.

Предложен новый каталитический вариант получения α -гидроксифосфонатов алифатического, ароматического и гетероароматического рядов. Показано, что использование сочетания катализа 1,5-диазабинцикло-[4.3.0.]нон-5-еном (DBN) и микроволнового облучения позволяет существенно повысить выходы конечных продуктов за счет сокращения образования побочных продуктов.

Разработан новый некаталитический способ получения биологически активных аминотилебисфосфонатов при микроволновом облучении, позволяющий получать конечные продукты с выходами, в несколько раз превышающими известные в литературе.

Разработана новая методика синтеза амидофосфатов на основе реакции Тодда-Атертона с использованием микроволнового облучения. Впервые в реакцию Тодда-Атертона введены малореакционноспособные α -аминофосфонаты со свободной аминогруппой.

Осуществлен направленный синтез неизвестных ранее биологически активных α -аминофосфонатов, аминотилебисфосфонатов и амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент в условиях микроволнового облучения.

Впервые осуществлено введение фармакогенных фосфорорганических заместителей в молекулы природных хлоринов – метилового эфира феофорбида *a* и хлорина *e*₆. Успешно проведен синтез α -амино-, α -гидроксифосфонатов, аминотилебисфосфоната и амидофосфата на основе этих соединений.

Полученные аминотилебисфосфонаты на основе адамантана исследованы в качестве препаратов против остеопороза.

Проведены биологические исследования синтезированных фосфорорганических соединений на основе природных производных хлоринов в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии рака. Показано, что введение амидофосфатной группировки в молекулу производного природного хлорина *e*₆ пятикратно увеличивает фототоксический

эффект на клетки аденокарциномы яичника человека по сравнению с известными препаратами.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 5 статей и 4 тезиса докладов.

Апробация работы.

Материалы диссертации доложены на ICCPC-XV Международной конференции по химии соединений фосфора (Санкт-Петербург-2008), а также на Fifth International conference on organic chemistry for young scientists (InterYCOS, Санкт-Петербург-2009), Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2007» (Москва-2007) и «Ломоносов-2009» (Москва-2009)

Объем и структура работы.

Работа изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, посвященного синтезу функционально замещенных фосфонатов, обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов. Диссертация содержит 85 схем, 18 таблиц и 4 рисунка, список цитируемых работ включает 210 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-03-00178 и гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-4365.2010.3.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка новых условий синтеза замещенных диалкилфосфонатов.

1.1. Синтез α -аминофосфонатов со свободной аминогруппой в двух- и трехкомпонентной системе в условиях микроволнового содействия

В отличие от *N*-замещенных α -аминофосфонатов, досконально изученных в течение последних десятилетий, аминофосфонаты со свободной аминогруппой изучены в значительно меньшей степени. Интерес к этому типу соединений связан с их высокой биологической активностью и структурным подобием α -аминокислотам, а также с широкими возможностями их модификации. Так, например, среди α -аминофосфоновых кислот найдены соединения, которые могут использоваться в качестве антибиотиков, ингибиторов энзимов, служат ключевыми соединениями при синтезе фосфонопептидов, обладают противовирусной и фармакологической активностью.

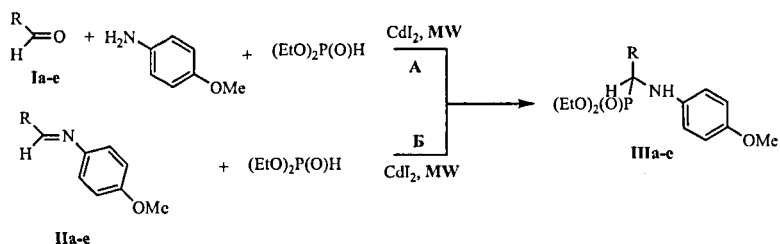
Двумя основными методами синтеза *N*-замещенных диэтил α -аминофосфонатов, известными из литературы, являются: взаимодействие альд- и кетиминов с *O,O*-диэтилфосфитом (реакция Пудовика, двухкомпонентная система), и реакция альдегидов или кетонов с амином и *O,O*-диэтилфосфитом (реакция Кабачника-Филдса, трехкомпонентная система). Каждый из этих подходов имеет свои синтетические преимущества: синтез в

двухкомпонентной системе характеризуется большей селективностью процесса и, как правило, несколько большими выходами продуктов по сравнению с реакцией в трехкомпонентной системе, в то время как проведение реакции в трехкомпонентной системе более удобно с препаративной точки зрения.

С целью синтеза α -аминофосфонатов со свободной аминогруппой нами первоначально получены *N*-*n*-метоксифенилзамещенные аминофосфонаты как в двух-, так и в трехкомпонентной системе в присутствии CdI_2 как катализатора в условиях микроволнового содействия.

Первоначально *N*-замещенные α -аминофосфонаты были получены в трехкомпонентной системе (схема 1, путь А), а именно взаимодействием различных альдегидов (Ia-e) с *n*-анилидином и диэтилфосфитом в присутствии каталитических количеств CdI_2 в условиях микроволнового содействия.

Схема 1



Реакцию проводили при соотношении реагентов карбонильное соединение – амин – О,О-диэтилфосфит 1:1:1 без растворителя в присутствии молекулярных сит 3А в качестве водоотнимающего средства. В этих условиях реакция прошла за 37-50 минут, и выходы конечных продуктов составили 55-91% (таблица 1).

Таблица 1. Синтез α -аминофосфонатов в трехкомпонентной системе в условиях микроволнового облучения

№ α -аминофосфоната	R	Время реакции, мин.	Выход после выделения, %	ЯМР ^{31}P , δ , м.д
IIIa	<i>i</i> -Pr	50	55	28.8
IIIб	Ph	39	85	21.8
IIIв	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄	41	88	21.5
IIIг	<i>n</i> -MeOC ₆ H ₄	37	90	23.3
IIIд	<i>n</i> -Me ₂ NC ₆ H ₄	49	89	23.7
IIIе	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	42	91	21.3

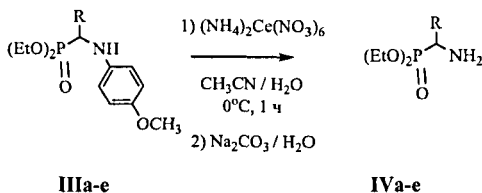
Реакцию иминов (IIIа-е) с О,О-диэтилфосфитом (синтез в двухкомпонентной системе, схема 1, путь Б) проводили при микроволновом облучении (102 Вт) при соотношении реагентов 1:1 в присутствии 5 мол% CdI₂ без растворителя в течение 25-40 минут (таблица 2). α-Аминофосфонаты (IIIа-е) были получены с высокими выходами 73-99%. В спектрах ЯМР ³¹P эти соединения имеют характерные сигналы в области 21.3-28.8 м.д.

Таблица 2. Синтез α-аминофосфонатов в двухкомпонентной системе в условиях микроволнового облучения

№ α-аминофосфоната	R	Время реакции, мин.	Выход после выделения, %	ЯМР ³¹ P, δ, м.д
IIIа	<i>i</i> -Pr	40	73	28.8
IIIб	Ph	27	97	21.8
IIIв	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄	30	98	21.5
IIIг	<i>n</i> -MeOC ₆ H ₄	25	99	23.3
IIIд	<i>n</i> -Me ₂ NC ₆ H ₄	37	98	23.7
IIIе	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	32	96	21.3

Для получения α-аминофосфонатов со свободной аминогруппой нами была выбрана известная реакция снятия защитной *n*-метоксифенильной группировки у атома азота α-аминофосфонатов (IIIа-е) церий (IV) аммоний нитратом (схема 2):

Схема 2



IIIа-е

IVа-е

R=*i*-Pr, Ph, *n*-MePh, *n*-MeOPh, *n*-Me₂NPh, *m*-NO₂Ph

В результате с выходом 80–89% были синтезированы соответствующие α-аминофосфонаты (IVа-е) со свободной аминогруппой.

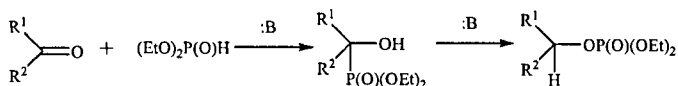
Таким образом, в первой части работы нами осуществлен двухстадийный синтез ряда α-аминофосфонатов различного строения со свободной аминогруппой при микроволновом облучении как в двух-, так и в трехкомпонентной системе в присутствии CdI₂. Полученные соединения были использованы в дальнейшем для синтеза α-фосфонамидофосфатов (см. раздел 2).

1.2. Синтез замещенных α -гидроксифосфонатов при микроволновом облучении

Реакция диалкилфосфитов с карбонильными соединениями (реакция Абрамова), приводящая к образованию α -гидроксифосфонатов, широко известна. Несмотря на то, что реакция была открыта в начале 50-х годов прошлого века, она и в настоящее время продолжает привлекать внимание исследователей, что связано, прежде всего, с простотой исполнения и практическим применением α -гидроксифосфонатов.

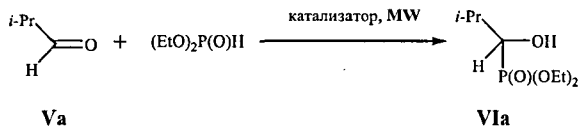
Анализ литературных данных показал, что взаимодействие диалкилфосфитов с карбонильными соединениями обычно проводят в присутствии основного катализатора, смещающего таутомерное равновесие диалкилфосфита в сторону трехкоординированной формы. В качестве катализаторов обычно используются алкоголяты металлов, третичные амины или неорганические основания в эквимольных или избыточных количествах. Однако проведение реакции в присутствии больших количеств основания часто сопровождается частичным распадом полученных α -гидроксифосфонатов (ретро-реакция Абрамова), либо образованием соответствующих фосфатов в результате фосфонат-фосфатной перегруппировки (схема 3).

Схема 3



В данной работе была исследована реакция альдегидов и кетонов с *О,О*-диэтилфосфитом в присутствии основных катализаторов и проведено сравнение их каталитической активности при микроволновом облучении. Для сравнения каталитического действия органических оснований при микроволновом содействии в качестве модели была выбрана реакция *О,О*-диэтилфосфита с *изо*-масляным альдегидом (**Va**) (схема 4).

Схема 4



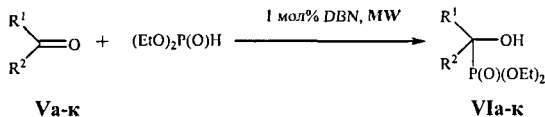
Указанную реакцию исследовали без растворителя при соотношении реагентов 1:1 в присутствии каталитических количеств (1 мол.%) органических оснований – PhNEt_2 , Et_3N и DBN , а также без катализатора. Кроме того, реакцию проводили при микроволновом облучении и при нагревании. В таблице 3 приведено время завершения реакции в зависимости от используемого катализатора, температуры и мощности микроволнового облучения.

Таблица 3. Разработка условий реакции О,О-диэтилфосфита с *изо*-масляным альдегидом в присутствии органических оснований

Катализатор (1 мол.%)	Время реакции при 20°C, ч	Время реакции при 40-60°C, ч	Время реакции при MW (200 Вт), мин	Время реакции при MW (400 Вт), мин
PhNEt ₂	>72	45-50	>120	45
Et ₃ N	>48	18-24	35	15
DBN	>24	4-6	6	1.5

Таким образом, сочетание катализа DBN и MW содействия мощностью 400 Вт позволяет быстро (за несколько минут) с высокими выходами получать α-гидроксифосфонаты различного строения (таблица 4). Следует отметить, что использование 1 мол.% DBN в сочетании с MW содействием не только приводит к образованию гидроксифосфонатов с высокими выходами, но и предотвращает протекание побочных процессов за счет уменьшения времени реакции. Добавление большего количества катализатора не приводит к существенному изменению выхода конечных продуктов, а в его отсутствие реакция вообще не проходит.

Таблица 4. Синтез α-гидроксифосфонатов в условиях микроволнового содействия



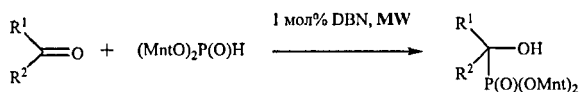
№ α-гидроксифосфоната	R ¹	R ²	Время реакции, мин.	Выход после выделения, %	ЯМР ³¹ P, δ, м.д.
VIa	H	<i>i</i> -Pr	1.5	98	25.3
VIб	H	Et	1	95	25.6
VIв	H	Ph	3	86	21.7
VIг	H	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	3.5	85	20.1
VIд	H	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄	9	82	21.2
VIе	H	2-Fur	1.5	95	19.6
VIж	H	2-Py	5	82	15.7
VIз		<i>γ</i> -C ₆ H ₁₀	4	84	26.8
VIи		<i>γ</i> -C ₅ H ₈	15	40	27.2
VIк	Me	Et	21	38	27.8

По данным ЯМР ³¹P, реакция альдегидов и кетонов (Va-з) с диэтилфосфитом в предложенных условиях проходит практически количественно. При использовании

альдегидов выход конечных продуктов зависит от их строения лишь в незначительной степени. В то же время в случае кетонов исследуемая реакция проходит легко только для циклогексанона (Vз), в то время как для циклопентанона (Vi) и метилэтилкетона (Vк) даже при более длительном нагревании удастся получить соответствующие α-гидроксифосфонаты с выходом лишь ~40% (таблица 4).

Простейшим способом наведения оптической активности является реакция присоединения хирального (-)-диментилфосфита к алифатическому и ароматическому альдегидам (Va,в), проведенная в условиях катализа DBN при микроволновом облучении. В результате этой реакции были получены соответствующие α-гидроксифосфонаты с соотношением диастереомеров ~1:1.2 (по данным ЯМР ³¹P). Выходы соответствующих конечных соединений при этом практически количественные (схема 5).

Схема 5



Va,в

VII a,в

Mnt= (-)-ментил;

R¹=H, R²=i-Pr (a), Ph (в).

Таким образом, нами показано, что проведение реакции альдегидов и кетонов различного строения с O,O-диалкилфосфитами в условиях катализа DBN и микроволнового облучения не только многократно ускоряет реакцию, но и дает возможность получать α-гидроксифосфонаты различного строения с высокими выходами.

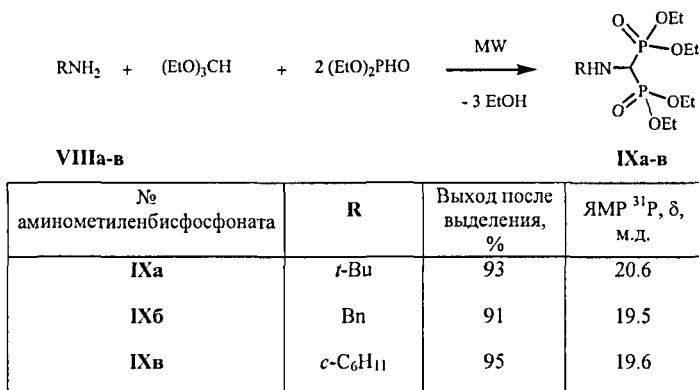
1.3. Синтез аминотилденбисфосфонатов при микроволновом облучении

Анализ литературных данных показал, что синтез аминотилденбисфосфонатов различного строения, проявляющих высокую противоопорозную активность, обычно проводят лишь одним методом, а именно длительным нагреванием (4-6 часов) смеси первичного амина, триэтилортоформиата и O,O-диэтилфосфита при 150°C. При этом выходы полученных таким образом аминотилденбисфосфонатов составляют 35-70% в зависимости от строения исходного амина. В некоторых случаях к реакционной смеси добавляют катализаторы, например кислоту Льюиса BF₃·Et₂O, однако это не приводит к существенному увеличению выходов конечных продуктов.

С целью оптимизации условий синтеза аминотилденбисфосфонатов нами была изучена реакция первичных аминов с ортоэфиром и O,O-диэтилфосфитом при микроволновом облучении. Реакцию проводили при соотношении реагентов амин-ортоэфир-

диэтилфосфит 1:1.5:4 в условиях отсутствия катализатора без растворителя в микроволновой печи (400 Вт, 150°C) в течение 25-35 минут (таблица 5).

Таблица 5. Синтез аминотилеиенбисфосфонатов в условиях микроволнового облучения



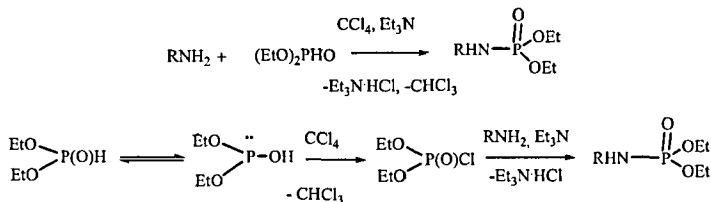
Спектры ЯМР ³¹P реакционной смеси показали, что данная реакция в условиях микроволнового облучения проходит практически с количественным выходом. Полученные аминотилеиенбисфосфонаты (IXa-в) имеют характерные сигналы в области 19.5-20.6 м.д. Найдено, что добавление в реакционную смесь катализаторов, в частности кислот Льюиса CdI₂ или BF₃·Et₂O несколько уменьшает время реакции, но практически не сказывается на выходе конечных продуктов.

Таким образом, нами были предложены новые условия получения аминотилеиенбисфосфонатов, позволяющие быстро, легко и с высокими выходами осуществлять синтез этих соединений.

2. Разработка оптимальных условий синтеза замещенных амидофосфатов.

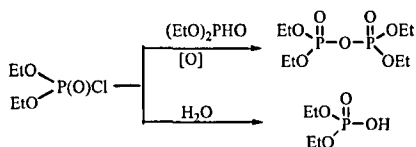
Интерес к функционально замещенным амидофосфатам связан с их высокой биологической активностью и с широкой областью использования этого класса фосфорорганических соединений в химии, биохимии и медицине. Так, соединения, содержащие P-N связь, являются эффективными ингибиторами ферментов, например, холестерол эстеразы, лейцин аминопептидазы, могут быть использованы для лечения различных вирусных заболеваний, в том числе и ВИЧ. Обычно, амидофосфаты получают либо при взаимодействии соответствующих аминов с хлорангидридами эфиров фосфорной кислоты при нагревании, либо по реакции Тодда-Атертона, которая позволяет генерировать промежуточный хлорангидрид эфира фосфорной кислоты *in situ* (схема 6).

Схема 6



Реакция Тодда-Атертона проходит как при комнатной температуре, так и при нагревании (от 2 до 17 ч в зависимости от строения исходных соединений) и может осложняться рядом побочных процессов, в частности образованием пирофосфатов и фосфатов (схема 7).

Схема 7

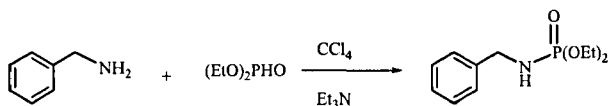


Образование последних особенно характерно для малореакционноспособных аминов.

В работе исследовано взаимодействие первичных аминов различного строения с O,O-диэтилфосфитом в условиях реакции Тодда-Атертона при микроволновом облучении. Для отработки оптимальных условий реакции Тодда-Атертона в качестве аминной компоненты был использован бензиламин. Реакцию проводили как при нагревании, так и микроволновом облучении при соотношении реагентов бензиламин-диэтилфосфит-триэтиламин 1:1:1 (таблица 6).

Оказалось, что при комнатной температуре реакция проходит за 2 ч только на 35%, а полностью заканчивается за 10 ч. При этом выход амидофосфата (X) после выделения составил 80%. Проведение этой же реакции при микроволновом облучении позволило многократно сократить время процесса (до 3 – 8 минут).

Таблица 6. Синтез О,О-диэтил (*N*-бензил) амидофосфата при микроволновом облучении



X

Температура	Время реакции	Выход амидофосфата X, %
20 °С	2 ч	35
20 °С	5ч	73
20 °С	10 ч	80
40 °С	1 ч	35
40 °С	2 ч	65
40 °С	3 ч	95
60 °С	1 ч	50
60 °С	2 ч	75
60 °С	3 ч	85
MW (102 Вт, 115°С)	3 мин	90
MW (102 Вт, 115°С)	6 мин	95
MW (102 Вт, 115°С)	8 мин	99

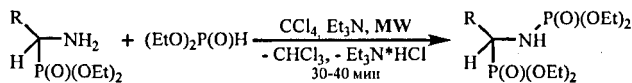
Среди производных амидофосфатов большой интерес вызывают α -фосфонамидофосфаты, которые содержат два четырехкоординированных атома фосфора в молекуле. Часть соединений этого типа обладают биологической активностью, другие используются в качестве хелатирующих реагентов некоторых ионов металлов.

Из литературных данных известно, что для получения α -фосфонамидофосфатов используется фосфорилирование некоторых α -аминофосфонатов со свободной аминогруппой диэтилхлорфосфатом в присутствии триэтиламина при 0°С. Выходы продуктов этой реакции не превышают 60%. Как было указано выше, разработанный нами способ синтеза α -аминофосфонатов с открытой аминогруппой дал нам возможность впервые получить фосфонамидофосфаты по реакции Готда-Атертона (таблица 7). Реакция была проведена впервые при микроволновом облучении в течение 30 – 40 минут. Выходы конечных соединений составили 63-93%.

Следует особо отметить, что в отличие от проведения реакции при микроволновом облучении, при комнатной температуре или нагревании конечные продукты образовывались

с выходами, не превышающими 10% (по данным спектроскопии ЯМР ^{31}P). Это объясняется тем, что в этих условиях происходит образование побочного продукта реакции – пирофосфата.

Таблица 7. Синтез фосфоамидофосфатов в условиях реакции Тодда-Атертона при микроволновом облучении



IVa-e

XIa-e

№ фосфоамидофосфата	R	Выход после выделения, %	ЯМР ^{31}P , δ , м.д.
XIa	<i>i</i> -Pr	78	7.94 д, 25.32 д ($^3J_{PP}$ 23.2 Гц)
XIб	Ph	85	6.78 д, 22.20 д ($^3J_{PP}$ 41.3 Гц)
XIв	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄	88	6.70 д, 22.27 д ($^3J_{PP}$ 42.7 Гц)
XIг	<i>n</i> -MeOC ₆ H ₄	93	6.78 д, 22.43 д ($^3J_{PP}$ 40.6 Гц)
XIд	<i>n</i> -Me ₂ NC ₆ H ₄	63	6.68 д, 22.20 д ($^3J_{PP}$ 40.2 Гц)
XIе	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	68	6.28 д, 20.56 д ($^3J_{PP}$ 41.4 Гц)

Все полученные соединения были охарактеризованы данными спектроскопии ЯМР ^{31}P , ^1H , ^{13}C и элементного анализа. Для фосфоамидофосфатов (XIa-e) в спектре ЯМР ^{31}P наблюдались дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия от 23.2 Гц (соед. XIa) до 42.7 Гц (соед. XIв).

В спектрах ПМР метиновый фосфонатный протон имеет характерный сигнал в области 4.4 – 4.6 м.д. В спектре ЯМР ^{13}C третичный атом углерода фосфонатной группы представляет собой дублет в области 51.3 – 53.8 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия $^1J_{PC} = 153 - 156$ Гц.

Таким образом, в данной части работы была разработана новая методика синтеза амидофосфатов на основе реакции Тодда-Атертона с использованием микроволнового облучения, что позволило ввести в реакцию малореакционноспособные амины, в том числе α -аминофосфонаты со свободной аминогруппой и с высокими выходами получить фосфоамидофосфаты.

3. Направленный синтез замещенных биологически активных фосфонатов и амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент, в условиях микроволнового облучения

Производные адамантана привлекают внимание исследователей в связи с широким спектром применения его производных. В частности, большой круг адамантильных производных проявляют антивирусную активность против гриппа и ВИЧ, а также лечебный эффект по отношению к эпилепсии. Что касается фосфорорганических производных адамантана, в литературе известны единичные примеры синтеза и применения подобных веществ. Так, в литературе описан О,О-диэтил (1-адамантан-1-ил-этил)-амидофосфат, лекарственный препарат, использующийся для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим направленный синтез неизвестных ранее фосфорорганических производных, содержащих адамантильный фрагмент, является актуальной задачей.

3.1. Направленный синтез α -аминофосфонатов, содержащих адамантильный фрагмент

Разработанные нами условия синтеза α -аминофосфонатов позволили нам получить ряд неизвестных ранее адамантилсодержащих α -аминофосфонатов. Реакцию Кабачника-Филдса с участием первичных аминалкадамантанов (XIIa-e), *изо*-масляного альдегида и О,О-диэтилфосфита (соотношение реагентов 1:1:1) проводили при микроволновом облучении в присутствии 5 мол.% CdI₂ и молекулярных сит 3А. Время реакции составило 20-35 минут (таблица 8).

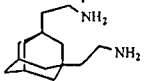
Таблица 8. Синтез α -аминофосфонатов, содержащих адамантильный фрагмент, в условиях микроволнового облучения



XIIa-e

XIIIa-e

№ α -аминофосфоната	A	R	Выход после выделения, %	ЯМР ³¹ P, δ , м.д.
XIIIa	-	H	72	28.5
XIIIб	-	Et	70	28.2, 28.8
XIIIв	-	Ph	80	28.0, 30.3

№ α -аминофосфоната	A	R	Выход после выделения, %	ЯМР ^{31}P , δ , м.д.
XIIIг	OCH ₂	H	82	28.2
XIIIд	CH ₂	Me	76	28.9, 29.5
XIIIе			68	28.7

По данным ЯМР ^{31}P выходы аминофосфонатов составили 85-92%, и 68-82% после выделения. Все полученные соединения выделяли методом колоночной хроматографии. Последующие попытки увеличить конверсию с помощью более продолжительного нагревания не привели к существенному улучшению выходов продуктов реакции. Все соединения были охарактеризованы совокупностью данных спектроскопии ЯМР ^{31}P , ^1H , ^{13}C и элементного анализа. В спектрах ЯМР ^{31}P аминофосфонаты имеют характерные для этого класса соединений сигналы в области 28.1-30.3 м.д. При проведении реакции с амином (XIIIе), содержащим две эквивалентные аминогруппы, был взят двукратный избыток диэтилфосфита и *изо*-масляного альдегида соответственно, что привело к образованию бис-(аминофосфоната) (XIIIе) с высоким выходом.

Для соединений XIIIб,в и д в спектрах ЯМР ^{31}P наблюдалось по два сигнала (таблица 8), соответствующих двум образующимся диастереомерам в соотношениях 2:1 (XIIIб), 1.2:1 (XIIIв) и 1.6:1 (XIIIд). В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C этих соединений также наблюдалось по два набора сигналов в указанных соотношениях.

Таким образом, в данной части работы нам впервые удалось синтезировать ряд неизвестных ранее адамантилсодержащих α -аминофосфонатов с использованием микроволнового облучения.

3.2. Направленный синтез аминотилеибисфосфонатов и

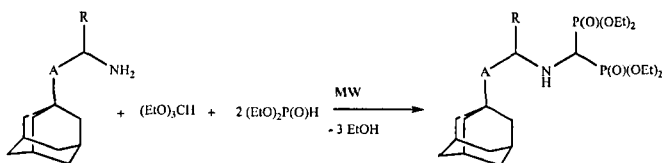
аминотилеибисфосфоновых кислот, содержащих адамантильный фрагмент

С целью синтеза новых бисфосфонатов и бисфосфоновых кислот, содержащих биологически активный адамантильный фрагмент, были использованы адамантилсодержащие амины (XIIа-е), ортоэфир и О,О-диэтилфосфит. Для всех выбранных аминов превращение прошло при микроволновом облучении (400 Вт, 150°C) без растворителя и катализаторов за 25-45 минут (таблица 9). Полученные аминотилеибисфосфонаты (XIVа-е) выделяли методом колоночной хроматографии. Следует особо подчеркнуть, что предложенным нами методом можно получать аминотилеибисфосфонаты с высокими выходами 62 – 90%.

Сигналы соединений (XIVa,г и е) в спектре ЯМР ^{31}P представляют собой синглет. Соединения (XIVв и д) имеют сигнал в виде квадруплета с константой спин-спинового взаимодействия $^2J_{PP}$ 39,5 - 43,4 Гц, что связано, по-видимому, с тем, что эти бисфосфонаты имеют не только объемный заместитель, но и асимметрический центр. Это приводит к неэквивалентности двух атомов фосфора (т.е. они становятся диастереотопными), и в этом случае в спектре наблюдается АВ – система.

Соединения XIVa-e также были охарактеризованы данными спектров ^1H , ^{13}C и элементным анализом. В спектре ПМР, кроме характерных сигналов этоксильных групп, сигнал метинового протона СНР представляет собой триплет в области 3.09-3.33 м.д. с $^2J_{PH} = 21 - 25$ Гц, что хорошо согласуется с литературными данными для аминотилеиенбисфосфонатов. В спектре ЯМР ^{13}C третичный атом углерода, связанный с двумя атомами фосфора и атомом азота, проявляется в области 51.17-58.26 м.д. в виде триплета с константой $^1J_{PC} = 142 - 146$ Гц.

Таблица 9. Синтез аминотилеиенбисфосфонатов, содержащих адамантический фрагмент, в условиях микроволнового облучения



XIVa-e

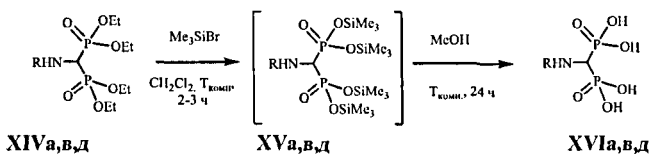
XIVa-e

№ аминотилеиен-бисфосфоната	A	R	Выход после выделения, %	ЯМР ^{31}P , δ , м.д.
XIVa	-	H	73	19.4 с
XIVв	-	Ph	62	20.04 к $^2J_{PP}$ 39.5 Гц
XIVг	OCH ₂	H	90	19.7 с
XIVд	CH ₂	Me	88	20.0 к $^2J_{PP}$ 43.4 Гц
XIVe			67	18.9 с

Для синтеза аминотилеиенбисфосфоновых кислот (XVIa-e) нами был использован известный метод удаления этоксильных группировок у четырехкоординированного атома фосфора, а именно, взаимодействие аминотилеиенбисфосфонатов (XIVa,в и д) с триметилбромсиланом с последующей обработкой промежуточно образующихся

триметилсилильных производных (XVa, в и д) метанолом при комнатной температуре. Выходы кислот (XVIa, в, д) составили 85-95% (схема 8).

Схема 8



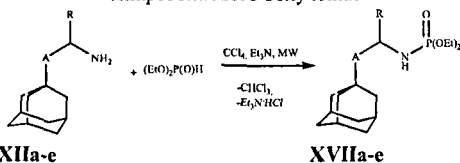
Таким образом, нам впервые удалось синтезировать аминотилеиенбисфосфонаты, содержащие адамантильный фрагмент, а также получить соответствующие замещенные бисфосфоновые кислоты. Полученные аминотилеиенбисфосфоновые кислоты были переданы на биологические испытания на противоостеопорозную активность.

3.3. Направленный синтез амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент

Для синтеза неизвестных ранее адамантилсодержащих фосфорорганических соединений нами исследовано взаимодействие соответствующих аминов (XIIa-e) с диэтилфосфитом в четыреххлористом углероде в присутствии триэтиламина при микроволновом облучении.

Использование микроволнового облучения позволило быстро (7-20 мин) с высокими выходами получить адамантилсодержащие амидофосфаты и практически полностью сократить образование побочных продуктов реакции (таблица 10).

Таблица 10. Синтез амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент, в условиях микроволнового облучения



№ амидофосфата	A	R	Выход после выделения, %	ЯМР ³¹ P, δ, м.д.
XVIIa	-	H	93	10.1
XVIIб	-	Et	85	9.1
XVIIв	-	Ph	84	8.5
XVIIг	OCH ₂	H	95	9.2
XVIIд	CH ₂	Me	87	7.7
XVIIе			82	9.2

Реакцию аминов (XIIa-e) с диэтилфосфитом в четыреххлористом углероде проводили при действии микроволнового облучения в присутствии эквимольного количества триэтиламина. По данным спектров ЯМР ^{31}P найдено, что реакция аминов (XIIa-e) с диэтилфосфитом в этих условиях проходит практически количественно. Все полученные соединения выделяли методом колоночной хроматографии. Строение и состав соединения (XVIIa-e) подтверждены данными спектроскопии ЯМР ^{31}P , ^1H и ^{13}C и элементного анализа.

При проведении реакции с амином (XIIe), содержащим две эквивалентные аминогруппы, был взят двукратный избыток диэтилфосфита и триэтиламина, что привело к образованию бис - (амидофосфата) (XVIIe) с высоким выходом. При введении в эту реакцию эквимольных количеств амина (XIIe), диэтилфосфита и триэтиламина также был получен и выделен только амидофосфат (XVIIe). Фосфорилирования только по одной из аминогрупп не наблюдалось.

Таким образом, нами получены неизвестные ранее амидофосфаты, содержащие адамантильные заместители, в условиях реакции Тодда-Атертона с адамантилсодержащими аминами при микроволновом облучении.

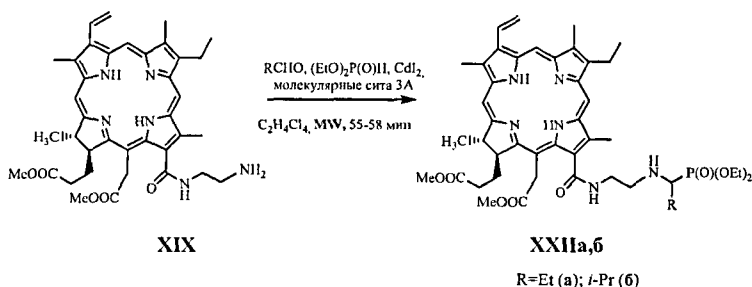
4. Введение фосфорорганических заместителей в молекулы природных хлоринов

В течение нескольких последних десятилетий производные природных порфиринов и хлоринов широко применяются при лечении рака, в офтальмологии, а также при диагностике различных заболеваний. Метод, в котором эти соединения используются в качестве фотосенсибилизаторов, называется фотодинамическая терапия (photodynamic therapy, PDT). В его основе лежит сочетание воздействия лекарства, света и кислорода, приводящее к разрушению клеток опухоли. Наиболее интересным с точки зрения PDT классом природных тетрапирролов являются хлорины, поскольку они поглощают свет в длинноволновой области ($\lambda > 650$ нм), то есть там, где поглощение хромофоров живой ткани минимально, и имеют большие коэффициенты экстинкции. Сочетание этих факторов приводит к более глубокому проникновению лекарства в опухоли и лучшему лечебному эффекту по сравнению с порфириновыми производными.

Для увеличения селективности аккумуляирования фотосенсибилизаторов на основе производных природных порфиринов в опухолевых клетках был проведен синтез замещенных хлоринов (в том числе бор-, амидо-, галогеналкилзамещенных, а также содержащих в своей структуре гетероциклы). Эти производные успешно прошли испытания в качестве фотосенсибилизаторов фотодинамической терапии рака, однако фосфорорганические соединения хлоринов до наших работ исследованы не были.

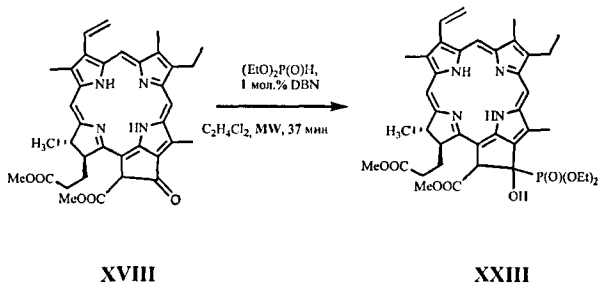
алифатическими альдегидами при микроволновом облучении в присутствии CdI_2 и молекулярных сит 3Å в дихлорэтано в качестве растворителя при соотношении реагентов: амин- альдегид- $(EtO)_2P(O)H$, 1:2:1 (схема 11). Время реакции составило 55-58 минут. α -Аминофосфонаты (**XXIIa,б**) были выделены препаративной колоночной хроматографией с выходами 72 и 80% соответственно.

Схема 11



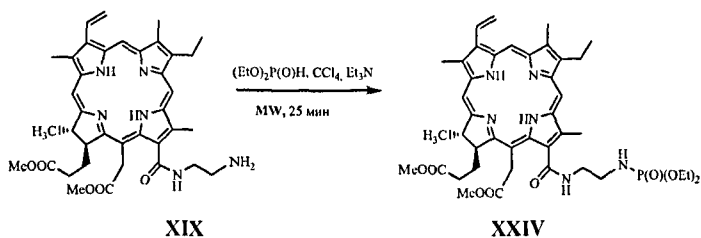
На основе метилового эфира феофорбида *a* был получен неизвестный ранее α -гидроксифосфонат (**XXIII**) с выходом 79%. Для его получения были использованы разработанные нами ранее условия проведения реакции Абрамова. Синтез проводили в микроволновой печи в дихлорэтано при соотношении реагентов феофорбид *a* - O,O-диэтилфосфит 1:1, в качестве катализатора был использован 1 мол.% DBN. Время реакции составило 37 минут (схема 12).

Схема 12



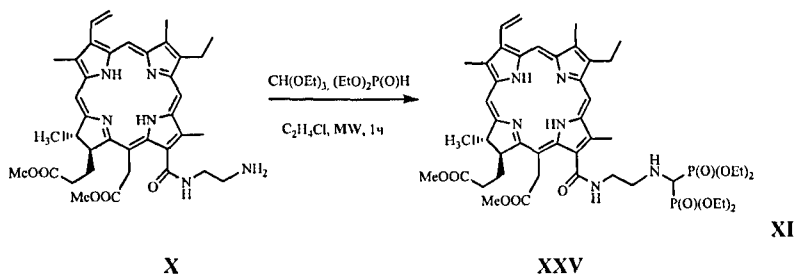
Синтез амидофосфата на основе природного хлорофилла *a* был проведен в разработанных нами условиях реакции Толда-Атертона при микроволновом облучении (схема 13) при соотношении реагентов 1:1:1, реакция закончилась за 25 минут. Амидофосфат (**XXIV**) был выделен с высоким выходом 94%.

Схема 13



Введение аминотилленбисфосфонатной группы в молекулу производного хлорина *e₆* было проведено взаимодействием аминопроизводного (XIX) с ортоформиатом и диэтилфосфитом.

Схема 14



XI

Аминотилленбисфосфонат (XXV), содержащий хлоринный фрагмент, получали при микроволновом облучении в дихлорэтане при соотношении реагентов амин- ортоформиат- O,O-диэтилфосфит = 1:1.5:4. Реакцию проводили в течение 1 часа. Однако выход продукта составил всего 17% (схема 14). Следует отметить, что увеличение времени реакции при микроволновом облучении не привело к увеличению выхода продукта реакции.

Контроль за ходом всех реакций осуществляли методом ТСХ. Все новые соединения (XX-XXV) охарактеризованы совокупностью данных масс-спектрометрии, спектров поглощения, а также ЯМР ¹H и ³¹P спектроскопии.

Таким образом, разработанные условия синтеза замещенных фосфонатов и амидофосфатов, позволили нам впервые ввести различные фосфорсодержащие заместители в молекулы производных природных феофорбида *a* и хлорина *e₆*. Полученные фосфорорганические производные хлоринов были исследованы в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии рака в Российском Онкологическом Научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН.

5. Изучение фосфорорганических производных хлорина e_6 в качестве фотосенсибилизаторов фотодинамической терапии рака

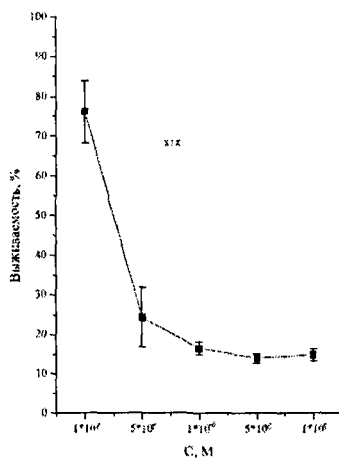
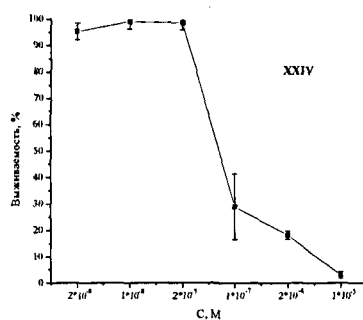
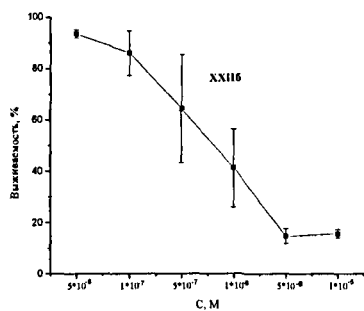
С целью изучения фосфорорганических производных хлорина e_6 в качестве фотосенсибилизаторов было исследовано цитотоксическое действие различных концентраций трех производных хлорина e_6 - α -аминофосфоната (XXIIб) и амидофосфата (XXIV), а также амида (XIX) *in vitro* на перевиваемую линию клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 как без облучения, так и при облучении лазером ($\lambda=666$ нм). Для сравнения был выбран известный препарат (XIX), не содержащий фосфорорганических заместителей, который в этих условиях исследован не был. Показателем эффективности препарата (фототоксичности) в данном исследовании являлась выживаемость клеток, которая вычисляется как отношение оптической плотности выживших клеток к оптической плотности контрольных клеток, умноженное на 100%. В качестве контрольных использовали клетки, которые не обрабатывали препаратами и не облучали.

Исследование выживаемости клеток проводили с помощью МТТ-теста, который основан на восстановлении желтой соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически-активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. Количество полученного в результате этой реакции формазана зависит от числа клеток и их жизнеспособности, и определяется спектрофотометрически.

В результате исследований было показано, что при обработке клеток исследуемыми препаратами без облучения цитотоксического действия не выявлено, то есть данные препараты не обладают темновым гемолитическим эффектом. Данные по фототоксическому эффекту препаратов (XIX), (XXIIб) и (XXIV) в зависимости от концентрации препарата представлены на рисунке 1.

Из представленных зависимостей видно, что при концентрации препаратов $1 \cdot 10^{-5}$ М выживаемость клеток составляет 15-17% как для амида (XIX), не содержащего фосфорного заместителя, так и для α -аминофосфоната (XXIIб), то есть при высокой концентрации фототоксическое действие этих препаратов на опухолевые клетки приблизительно одинаково. Что касается амидофосфата (XXIV) при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М выживаемость клеток составляет уже 3%, то есть введение амидофосфатного заместителя в молекулу производного природного хлорина пятикратно увеличивает фототоксический эффект препарата.

Рисунок 1



Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что введение в молекулу природного хлорина e_6 амидофосфатного заместителя приводит к пятикратному увеличению фототоксического эффекта на клетки аденокарциномы яичника человека по сравнению с известным препаратом (XIX).

Выводы:

1. Изучена синтетическая возможность создания Р-С-N, Р-С-O и Р-С-P связей при микроволновом облучении.

2. Исследован двухстадийный синтез α -аминофосфонатов со свободной аминогруппой, включающий в себя получение аминоксифосфонатов в двух- и трехкомпонентной системе при микроволновом облучении с последующим удалением защитной группировки с атома азота

3. Предложен новый каталитический вариант получения α -гидроксифосфонатов. Показано, что использование сочетания катализа 1,5-дизабицикло-[4.3.0.]-нон-5-ена (DBN) и микроволнового облучения позволяет существенно повысить выходы конечных продуктов.

4. Разработана новая методика синтеза амидофосфатов на основе реакции Тодда-Атертона с использованием микроволнового облучения, что позволило впервые ввести в реакцию Тодда-Атертона малореакционноспособные α -аминофосфонаты со свободной аминогруппой.

5. Осуществлен направленный синтез неизвестных ранее биологически активных α -аминофосфонатов, аминотиленисфосфонатов и амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент в условиях микроволнового облучения.

6. Впервые осуществлено введение фосфорорганических заместителей в молекулы природных хлоринов – метилового эфира феофорбида *a* и хлорина *e*₆. Успешно проведен синтез α -амино-, α -гидроксифосфонатов, аминотиленисфосфоната и амидофосфата на основе этих соединений. Проведены биологические исследования синтезированных фосфорорганических соединений на основе природных производных хлоринов в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии рака. Найдено, что введение амидофосфатной группировки в молекулу производного природного хлорина *e*₆ пятикратно увеличивает фототоксический эффект на клетки аденокарциномы яичника человека по сравнению с известными препаратами.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

1. М. М. Кабачник, Л. И. Минаева, И. П. Белецкая. Каталитический синтез α -гидроксифосфонатов. *ЖОрХ*, 2009, 45(8), 1135-1137.
2. M. M. Kabachnik, L. I. Minaeva, I. P. Beletskaya. Synthesis of novel α -aminophosphonates containing adamantyl fragment. *Synthesis*, 2009, 14, 2357-2360.
3. Л. И. Минаева, Л. С. Патрикеева, Б. С. Орлинсон, И. А. Новаков, М. М. Кабачник, И. П. Белецкая. Синтез новых амидофосфатов, содержащих адамантильный фрагмент, в условиях микроволнового облучения. *ЖОрХ*, 2010, 46(2), 162-165.
4. Л. И. Минаева, Л. С. Патрикеева, М. М. Кабачник, И. П. Белецкая. Фосфорилирование amino(арил)метилфосфонатов в условиях реакции Тодда-Атертона. *ЖОрХ*, 2010, 46(10), 1572-1573.

5. L. I. Minaeva, M. M. Kabachnik, G. V. Ponomarev, Yu. V. Morozova, I. P. Beletskaya. Synthesis of novel chlorine e_6 derivatives containing phosphorus groups. *Synthesis*, **2010**, *14*, 2451-2455.
6. Л. И. Минаева, Е. В. Виллемсон, М. М. Кабачник, И. П. Белецкая. Микроволновое содействие в синтезе amino- и гидроксифосфонатов. ICCPC-XV Международная конференция по химии соединений фосфора. Санкт-Петербург **2008**. Book of abstracts, p. 396.
7. L. I. Minaeva, E. V. Villemson, M. M. Kabachnik. Phosphorus containing natural porphyrin derivatives and its' biological activity. Fifth International conference on organic chemistry for young scientists (InterYCOS-2009). Book of abstracts, p.156.
8. Л. И. Минаева, Е. В. Виллемсон, М. М. Кабачник. Фосфорзамещенные производные природных порфиринов и их биологическая активность. XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009». Материалы докладов, подсекция «Органическая химия», с. 64.
9. Л. И. Минаева, М. М. Кабачник. Синтез α -амино- и α -гидроксифосфонатов при микроволновом облучении. IX Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2007». Материалы докладов, подсекция «Органическая химия», с. 325.

Подписано в печать: 29.10.2010

Заказ № 4417 Тираж - 120 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru