creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265576

2016년 2월

석사학위 논문

Synthesis and Antiviral Activity of Fluorinated Apiosyl Nucleoside Phosphonic Acids

조선대학교 대학원

약 학 과

김 세 연

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Synthesis and Antiviral Activity of Fluorinated Apiosyl Nucleoside Phosphonic Acids

항바이러스제로서 불소 함유 에피오실 뉴클레오사이드 포스폰산의 합성

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

약 학 과

김 세 연

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Synthesis and Antiviral Activity of Fluorinated Apiosyl Nucleoside Phosphonic Acids

지도교수 홍 준 희

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

약 학 과

김 세 연

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김 세 연의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이원재 (인)

위 원 조선대학교 교수 김은애 (인)

위 원 조선대학교 교수 홍준희 (인)

2015년 11월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

약 어

ABSTRACT

Ⅰ. 연구 배경 ····· 2

Ⅱ. 서 론 ····· 4

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 7

Ⅳ. 결 론 ····· 17

Ⅴ. 실험 방법 ····· 18

참고문헌

국문 초록

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

FIGURE 1 ····· 5

Synthesis rationale of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiose nucleoside phosphonic acids as potent antiviral agents

FIGURE 2 ····· 7

NOE differences between the proximal diastereotropic hydrogens of 9a and 9b

FIGURE 3 ····· 9

NOE differences between the proximal diastereotropic hydrogens of 17α and 17β

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Schemes

SCHEM 1 ····· 8

Synthesis of 2',5,5-trifluorinated-3'-hydroxy-apiose intermediate 16

SCHEM 2 ····· 11

Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl denosine phosphonic acid analogues

SCHEM 3 ····· 12

Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl guanosine phosphonic acid analogues

SCHEM 4 ····· 13

Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl cytosine phosphonic acid analogues

SCHEM 5 ····· 14

Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl uracil and thymine phosphonic acid analogues

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

TABLE 1 ····· 16

Median effective (EC_{50}) and cytotoxic (CC_{50}) concentrations of the synthesized nucleoside analogues

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

약 어

ACV : Acyclovir
AIDS : Acquired Immune Deficiency Syndrome
AZT : Azidothymidine
CC50 : Cytotoxic concentration of 50%
DCE : Dichloroethane
DIBAL-H : Diisobutylaluminum hydride
DME : Distance Measurement Equipment
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DNA : Deoxyribonucleicacid
EC50 : Median effective concentration of 50%
GCV : Ganciclovir
HCMV : Human cytomegalovirus
HIV : Human immunodeficiency virus
HPLC : High perfomanece liquid chromatography
HSV : Herpes simplex virus
LiHMDS : Lithium hexamethyldisilazane
MC : methylene chloride
NFSI : N-fluorodibenzenesulfonimide
NMR : Nuclear magnetic resonance
NOE : Nuclear overhauser effect
PMDTA : Pentamethyldiethylenetriamine
PMEA : 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine
PNP : Purine nucleoside phosphorylase
RNA : Ribonucleic acid
TBAF : Tetra butyl ammonium fluoride
TBDMSCI : Tert-Butyldimethylsilyl chloride
TBSCl : organic compounds containing carbon–silicon bonds
THF : Tetrahydrofuran
TLC : Thin layer chromatography
TMSOTf : Trimethylsilyltriflate
UV : Ultraviolet

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Synthesis and Antiviral Activity of Fluorinated Apiosyl Nucleoside Phosphonic Acids

Kim Se Yeon
Advisor : Prof. Hong Joon Hee, Ph.D.
Department of Pharmacy
Graduate School of Chosun University

Drug candidate substances with one or more fluorines are becoming commonplace. As antiviral nucleosides containing a fluorine atom at 2′-position are endowed with increased stabilization of the glycosyl bond. It was of interest to investigate the influence of the three fluorine atoms at the 2′- and 5′-position of apiosyl nucleoside phosphonate analogues. Various pyrimidine and purine 2′,5′,5′-trifluoro-3′-hydroxy-apiose nucleoside phosphonic acid analogues were synthesized from 1,3-dihydroxyacetone. Electrophilic fluorination of lactone was performed using NFSI. Condensation successfully proceeded from a glycosyl donor with persilylated bases to yield the nucleoside phosphonate analogues. Deprotection of diethyl phosphonates provided the final phosphonic acid sodium salts. The synthesized nucleoside analogues were subjected to antiviral screening against various viruses.

Keywords : antiviral agents; Vorbrüggen reaction; 2′,5′,5′-trifluoro-3′-hydroxy-apiose nucleoside phosphonic acid analogues;

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 연구 배경

오늘날 첨단 과학기술의 발전과 경이적인 의학의 발달에도 불구하고 지금도 전염병은 많은 사람들에게 엄청난 공포로 다가오며 여전히 인류가 극복해야 할 숙제로 남아있다. 교통이 발전하고 사람들 간의 이동이 급증하면서 전염병의 전파 속도도 빨라졌기 때문이다. 여러 신종 병원균의 발견과 백신의 개발에도 백신을 뛰어넘어 끊임없이 진화하고 변종하는 수많은 바이러스들 때문에 WHO(세계보건기구)는 21 세기를 '전염병의 시대' 라고 규정했으며 바이러스에 의한 재앙이 재현될 수 있다고 경고하고 있다.

그리스어로 Pan(모두)과 Demic(사람)의 합성어인 Pandemic(판데믹)은 '전국적으로 퍼지는', '광역의' 라는 뜻을 가지며, WHO 가 분류한 전염병 경고 단계 중 최고 등급인 6 단계로 전염병 대유행 상태를 말한다. 최근 우리나라에 중동 호흡기 증후군인 MERS-CoV(메르스 코로나 바이러스)의 확산은 사람들을 큰 불안과 혼란 속에 빠지게 하며 Pandemic 의 우려를 낳게 했다. 그뿐만 아니라 20 세기 말부터 최근까지 지금껏 인류가 전혀 경험하지 못한 새로운 전염병들이 세계 도처에서 속속 등장해 확산되고 있다. 앞서 말한 MERS-CoV 를 포함한 대표적인 예로는 AI(조류 인플루엔자), SARS(중증 급성 호흡기 증후군), H1N1(신종인플루엔자 A) 그리고 Evola virus(에볼라 출혈열) 등이 있다.

하지만 무엇보다 20세기의 가장 무서운 전염병으로는 인간의 면역계 세포를 파괴하고 죽음으로 몰아넣는 AIDS(후천성 면역 결핍증)가 있다. AIDS의 원인이 되는 HIV(인체 면역 바이러스)는 일종의 Retrovirus이며 HIV-1과 HIV-2가 있는데, HIV-1은 미국·유럽·아시아 지역 등 전 세계에 지배적이고 HIV-2는 서아프리카 지역에서 유행하는 바이러스이다. HIV-2는 HIV-1보다 진행 속도가 늦고 발병률도 훨씬 낮다. 이러한 바이러스는 자가증식할 수 없기 때문에 숙주세포에 붙어 생물의 DNA로부터 Transcription 하여 이와 상보적인 RNA를 생성하고 Replication 하며 새롭게 변이하면서 증식한다. 이것을 타깃으로 Retrovirus에 의해 합성되는 Viral DNA 형성을 저해하기 위해 항 HIV 활성을

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나타내는 Nucleosides analogue를 이용하여 바이러스의 증식을 막을 수 있다. Nucleosides analogue는 세포 내에서 인산화되어 활성을 나타내며 바이러스 복제와 종양 조직 성장을 저해하는 아주 강력하고 효과적인 화합물이다. 항바이러스제는 대부분 Nucleosides에 속하는 유도체이며, 이로부터 새로운 활성을 나타내는 물질을 찾고자 다양한 연구들이 진행되고 있다. AIDS의 치료제로 공인된 NRTI(Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor)는 AZT(Zidovudine), ddI(Didanosine), ddC(Zalcitabine), 3TC(Lamivudine), D4T(Stavudine) 등이 있다. 물론 치료에 효과적인 약물들이지만 완치는 되지 않으며 장기간 복용시 내성 발현이나 독성 등 심각한 부작용의 위험성으로 아직 확실한 효과를 나타내는 치료제는 없는 상황이다.

따라서 선택성이 높고 뛰어난 약효를 가지며 부작용을 나타내지 않는 안정적인 항바이러스제의 개발이 매우 시급하다. 본 연구에서는 새로운 활성이 기대되는 뉴클레오사이드 유도체를 합성하고 그 활성을 측정함으로써 궁극적으로 우수한 약효를 나타내는 약물을 개발하고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 서 론

의약화학과 약물 설계 분야에서 불소 원자의 도입은 대사 안정성을 높여 약물의 작용시간을 개선하고 물리·화학적 성질을 변화시킴으로써 약물의 체내흡수율과 생체이용률을 높여 약효를 증진시킨다. 또한 산화적 대사에 의해 생성되는 반응성이 큰 중간체의 형성을 저해하며 약물과 단백질 사이의 공유결합 형성을 저해하고 능동수송체에 대한 결합과 단백결합력을 변화시켜 능동수송에 의한 약물의 담즙배설을 저해하고 아마이드 동배체로 작용하여 단백질 가수분해를 방해함으로써 약물의 대사적 안정성을 개선하고 불소 원자와 단백질 사이의 직접적 상호작용에 의하여 특정 단백질과의 결합력과 선택적 반응성을 높이는 역할을 한다.

이렇듯 불소 원자를 포함하는 많은 뉴클레오사이드 유도체들은 작지만 수소결합을 할 수 있는 강한 산성으로 강력한 항바이러스 활성뿐만 아니라 자발적인 화학적, 약리학적 성질을 나타낸다. 따라서 뉴클레오사이드 유도체 당 부분의 2′ 와 3′ 위치에서의 플루오르화는 효과적이고 화학적으로 안정적인 항바이러스제의 개발을 위해 광범위하게 연구되어 왔다.[1] 2′ 위치에 불소 원자가 치환된 뉴클레오사이드의 항바이러스 활성이 글리코실 결합의 안정성을 증가시키는 특징은 매우 흥미로운 사실이다. 반면에 이런 글리코실 결합의 안정성 때문에 강한 산성의 불소 원자에 의한 글리코실 결합의 분열로 옥소늄 이온의 불안정화를 발생시킬 수 있다.[2]

포스포네이트와 구조적으로 변형된 포스포네이트의 동배체들은 생물학적 시스템에서 인산염을 모방할 수 있다.[3] 화학 약품이나 에스테라아제에 의해 가수분해하는 인-탄소 포스포네이트 결합의 저항은 그들의 작용 증가의 원인이 되는 특성 중 하나이다. 포스포네이트의 α-carbon에서 불소 원자의 치환은 기하학적이고 전자적인 요인의 결과로 인산염 모방의 효과를 증가시킬 수 있다.[4] 플루오로포스포네이트에 의한 포스포네이트의 대체는 상당한 활성을 나타내는 많은 유도체들을 제공하고 있다.[5]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라아제(PNP)는 퓨린 뉴클레오사이드의 동화 경로와 이화 경로의 핵심 효소로써 각각의 유리 염기와 Ribose- 또는 2-deoxyribose-α-1-phosphate의 이노신, 2′-deoxyinosine, 구아노신 그리고 2′-deoxyguanosine 과 같은 뉴클레오사이드를 가역적으로 가인산분해되도록 촉매 작용을 한다.[6] 유전적으로 PNP가 결핍된 사람들은 그들의 면역 시스템의 T 세포 성분의 손상으로 고통받지만 정상적인 B 세포 기능을 가진다.[7] 이런 관찰들은 PNP 억제제가 면역 억제제 뿐만 아니라 T 세포 백혈병과 같은 T 세포 증식성 질환에 대한 치료에도 매우 유용할 것이라고 제안되었다.[8] 9-(5,5-Difluoro-5-phosphonopentyl)guanine은 PNP의 기질 유도체 억제제로 사용되었다(Figure 1).[9]

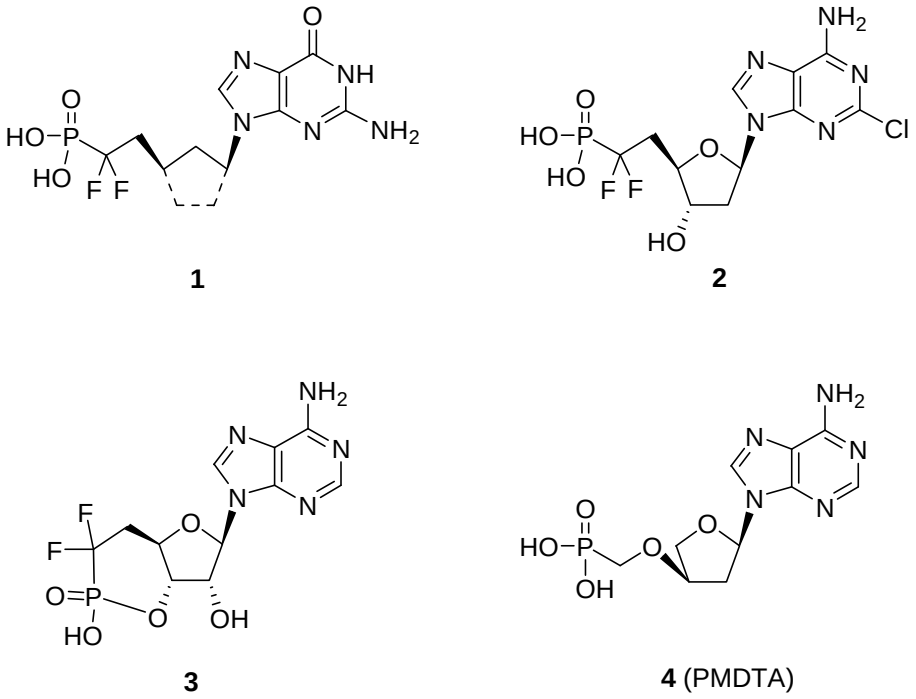


Figure 1: Synthesis rationale of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiose nucleoside phosphonic acids as potent antiviral agents

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2-Chloro-2′, 5′-dideoxy-5′-difluoromethylphosphinyl adenosine (2CDPA, 2)은 2-chlorodeoxyadenosine 일인산염의 가수분해되기 쉽지 않은 유도체로써 2CDA의 교란된 대사 경로를 극복하기 위한 난치성 만성 백혈병과 모양 세포 백혈병의 치료를 위해 준비되었다.[10] 그러나 다양한 T 세포에 수행된 생물학적 시험은 2CDPA가 예측된 세포독성 효과를 나타내지 않다는 것을 보여주었다. 독성의 결핍은 아마도 T 세포 내의 불충분한 인산화 단계에 의해서 발생한다. Usman과 그의 동료들은 RNA 중합 효소의 기질로써 Difluorinated cyclomonophosphonate 유도체를 개발했다. 하지만 생물학적 데이터는 보고되지 않았다.[11]

최근에 PMDTA와 같은 Apiose 5′-nor nucleoside phosphonate[12] 가 합성되었고 촉망되는 항HIV 특성을 나타내었다. 게다가 아피오스 뉴클레오사이드의 이인산염은 여러 중합 효소에 의해 기질로 인식되었고 DNA에 효소로 결합할 수 있었다.[13] 덧붙여서, 이런 뉴클레오사이드들은 Hammerhead 리보자임의 촉매 영역에서 리보뉴클레오사이드의 대체물로써 수용되지만,[14] 리보자임의 촉매 효율이 현저하게 감소되었다.[15] PMDTA는 퓨라노오즈 고리의 3′ 위치에 포스포노메톡시 그룹을 가지고 있고 4′ 위치에는 대체물을 가지고 있지 않다.[16] 이런 4′-hydroxymethyl 그룹의 결핍은 Kinases의 인산화 반응 동안 입체장애의 문제들을 피하게 해준다.

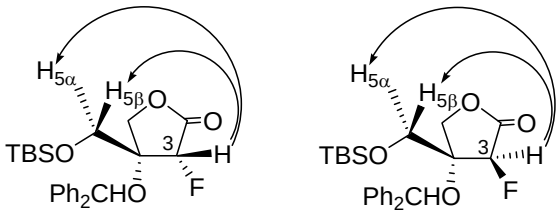
따라서 본 연구에서는 5′-deoxy-5′, 5′-difluoromethyl의 등전자와 동배체 합성을 서술하였고 더 효력 있는 항바이러스제를 찾고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결과 및 고찰

Schem 1에 보이는 바와 같이 목표 화합물은 이미 알려진 합성법을 참고하여 1,3-dihydroxyacetone을 출발물질로 하여 순조롭게 얻어진 락톤 유도체 6을 통해 합성하였다.[17] 25°C 에서 염화 메틸렌(MC, Methylene chloride)에 TBSCI과 함께 선택적인 Protection을 하여 O-silyl ether 7을 얻었다. 70°C 에서 CH_3CN에 Diazo(diphenyl)methane[18]과 함께 7의 삼차알코올을 Diphenylmethylation[19]하여 락톤 8을 얻었고 친전자성 플루오르화 단계(LiHMDS/NFSI)를 이용하여 락톤 유도체 8을 플루오르화 하였다.[20] 불소 원자의 첨가를 위해 시약의 첨가 순서는 중요하다. 락톤과 NFSI(N-fluorodibenzenesulfonimide)을 THF(Tetrahydrofuran)에 용해시키고 -78°C 에서 냉각시켰다.[21] LiHMDS(Lithium hexamethyldisilazane)을 천천히 첨가하여 각각의 수율이 33% 와 30%인 화합물 9a와 9b를 얻었다. 두 화합물의 NOE 실험은 β방향 플루오르화는 9b(NOE : H3/H5α, 0.6%; H3/H5β, 0.7%) 이성질체이고, α방향 플루오르화는 9a(NOE : H3/H5β, 1.0%; H3/H5α, 1.2%) 이성질체라는 것을 보여준다(Figure 2). 락톤 9b는 1시간 동안 -78°C 에서 톨루엔에 DIBAL-H(Diisobutylaluminum hydride)로 처리되어 감소되며 락톤 10으로 전환된다. 아노머 위치의 Protection은 포스포네이션 이전 단계에 필요로 했다.



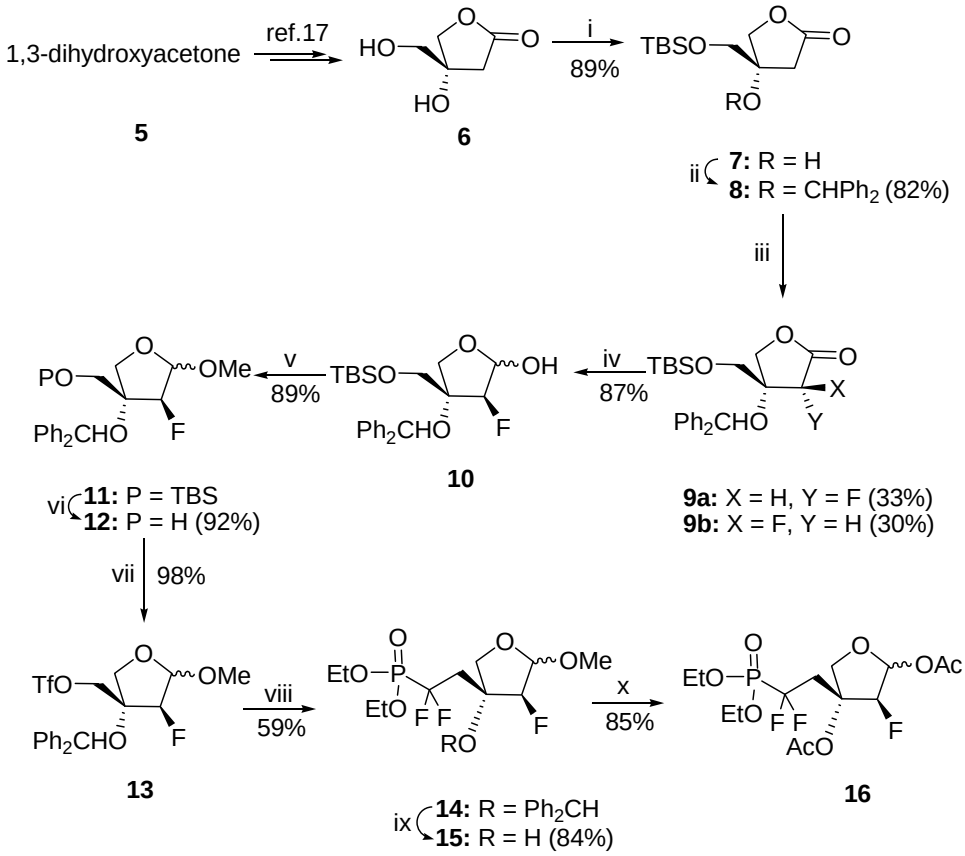
9a **9b**

Figure 2. NOE differences between the proximal diastereotropic hydrogens of **9a** and **9b**

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Scheme 1: Synthesis of 2',5,5-trifluorinated-3'-hydroxy-apiose intermediate **16**



Reagents: i) TBSCl, imidazole, CH_2Cl_2; ii) Ph_2CN_2, CH_3CN; iii) NFSI, LiHMDS, THF; iv) DIBALH, toluene, -78 ^oC; v) $CH(OMe)_3$, BF_3/OEt_2, Et_2O, 4 A molecular sieve; vi) TBAF, THF; vii) Tf_2O, pyridine, CH_2Cl_2; viii) $LiCF_2P(O)(OEt)_2$, HMPA, THF; ix) H_2, 10%Pd/C, EtOH; x) Ac_2O, AcOH, H_2SO_4, EtOAc.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아노머 위치의 메톡시화는 불안정한 TBS protection 그룹의 산성 조건 하에 조건[CH(OMe)3, BF3/Et2O]으로써 89% 수율의 글리코시드 11을 얻게 하였다.[22] TBAF(Tetra butyl ammonium fluoride)에 의한 글리코시드 11의 TBS 그룹의 제거는 92% 수율의 알코올 12를 얻게 하였다. Berkowitz의 연구에 따르면 Triflate 치환에 의한 Triflation으로 12는 Difluorophosphonate 유도체 13으로 전환된다.[23] 적합한 글리코실레이팅 화합물 15의 준비는 30% 이하의 낮은 수율에서 1,3-O-diacetyl-furanoside 16의 아노머 혼합물을 제공하기 위해 산성 조건(Ac2O, AcOH, H2SO4, EtOAc, 0°C)[24] 하에 화합물 13의 직접적인 아세트산분해를 통해 수행하였다. 따라서 가수분해와 아세트산분해에서 증가된 수율의 16을 얻기 위해 2 step에 걸쳐 반응을 진행하였다. 화합물 14로부터 디페닐메틸 그룹의 제거는 15를 얻게 하는 가수분해의 촉매 조건 하에 수행하였다.[25] 그것은 2 step에 걸쳐 74.4% 수율의 글리코실레이팅 화합물 16을 얻게 하는 아세트산 분해 반응을 일으킨다. 아데닌 뉴클레오사이드 합성은 DCE(Dichloroethane)에 촉매제로써 TMSOTf(Trimethylsilyltriflate)와 실릴화 된 6-chloropurine을 함께 화합물 16의 Vorbrüggen 축합[26]을 수행하여 각각의 6-chloropurine 유도체인 17α 와 17β를 얻게 한다. 완성한 NOE(Nuclear overhauser effect) 실험은 상대적인 입체구조를 명확하게 나타낸다(Figure 3).

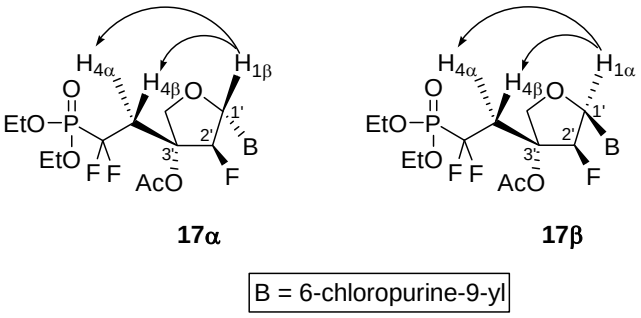


Figure 3. NOE differences between the proximal diastereotropic hydrogens of **17a** and **17b**

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

두 화합물의 NOE 실험은 α방향 글리코실화는 17α(NOE : H1β/H4β, 1.1%; H1β/H4α, 0.9%) 이성질체이고, β방향 글리코실화는 17β(NOE : H1α/H4α, 0.5%; H1α/H4β, 0.6%) 이성질체라는 것을 보여준다. 퓨린 유도체 17β로부터 염소 그룹은 64°C에서 메탄올 성 암모니아와 함께 아민을 전환시켜 탈아세틸화된 66% 수율의 아데노신 포스포네이트 유도체 18을 얻었다. 18의 디에틸 포스포네이트 작용기 그룹의 가수분해는 Dowex-Na+ 수지의 이온교환과 2,6-lutidine의 존재 하에 CH_3CN에 Bromotrimethylsilane을 첨가하여 아데노신 시클로모노포스폰산 나트륨 염 19를 얻게 한다(Scheme 2).[27] 화합물 18의 구조는 다양한 분광 분석에 의해 명확하게 측정되었다 : 1H NMR, 13C NMR, 31P NMR, HPLC, UV, HRMS.

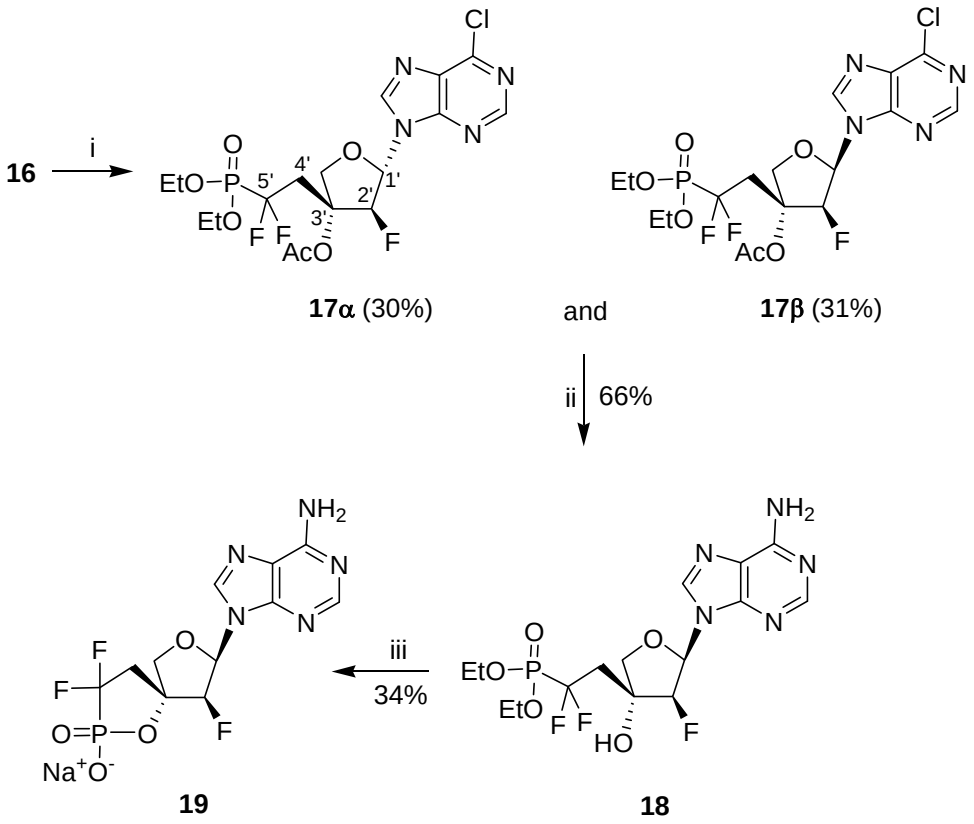
글리코실 공여체 16과 2-fluoro-6-chloropurine의 축합[28]은 17α 와 17β 화합물의 합성법과 유사한 조건 하에 진행하였고 각각 33%와 32% 수율의 20α 와 20β를 얻게 하였다. 17α 와 17β 화합물에 사용한 NOE 실험을 통해 퓨린 유도체 20α 와 20β의 상대적인 입체구조를 측정하였다. DME에 화합물 20β을 가볍게 암모니아 버블링하여 2-fluoro-6-aminopurine[29] 유도체 21(13%)과 2-amino-6-chloropurine 유도체 22(41%)를 각각 얻었다. 2-amino-6-chloropurine 유도체 22는 TMSBr 과 2,6-lutidine를 처리하여 포스폰산 염을 얻게 하고, Dowex-Na+ 수지의 이온교환과 메탄올의 존재 하에 나트륨 메톡시드와 2-mercaptoethanol을 처리하여 구아노신 시클로모노포스폰산 나트륨 염 23 을 얻는다(Scheme 3).[30]

글리코실 공여체 16과 N_4-benzoyl 시토신의 축합은 아데닌 유도체의 합성법과 유사한 조건 하에 진행하였고 각각 35%와 34% 수율의 24α 와 24β를 얻게 하였다. 디에틸 포스포네이트의 가수분해에 의한 24β의 가암모니아 분해는 시토신 시클로모노포스폰산 나트륨 염 26을 얻게 한다(Scheme 4). 또한 Uracil 과 Thymine 뉴클레오사이드 유도체인 31과 32는 16으로부터 축합과 Deprotection의 단계를 거쳐 합성하였다(Scheme 5).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Scheme 2. Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl adenosine phosphonic acid analogues

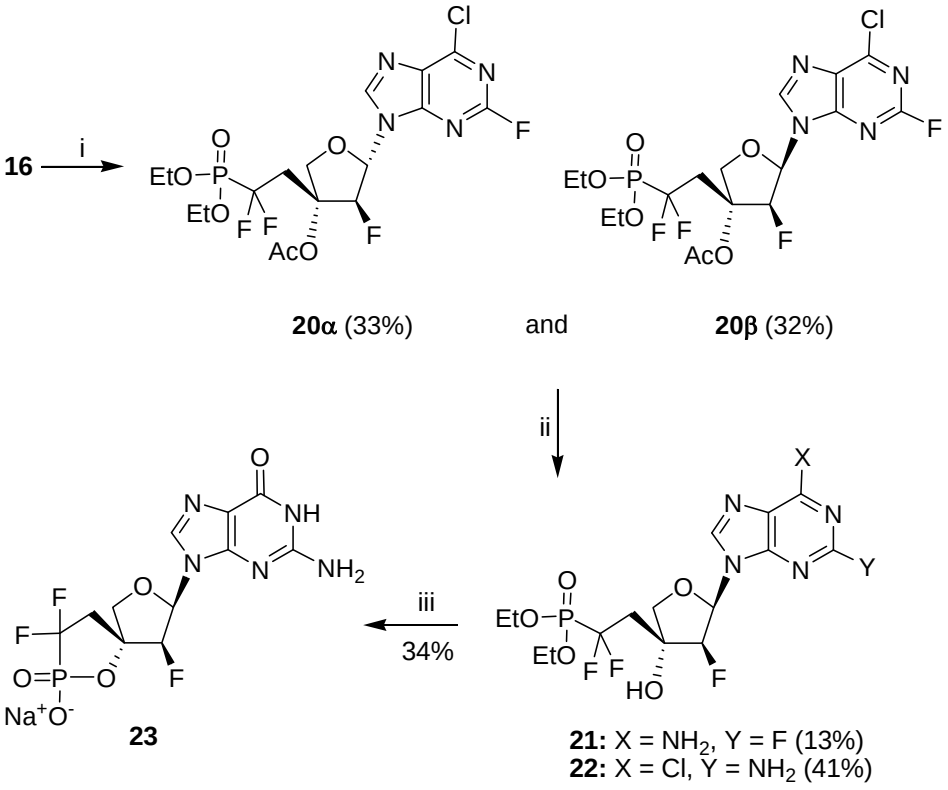


Reagents: i) Silylated 6-chloropurine, TMSOTf, DCE; ii) NH_3/MeOH, 64 ^oC; iii) (a) TMSBr, 2,6-lutidine, CH_3CN; (b) C_{18} HPLC, Dowex-Na^+.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Scheme 3. Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl guanosine phosphonic acid analogues

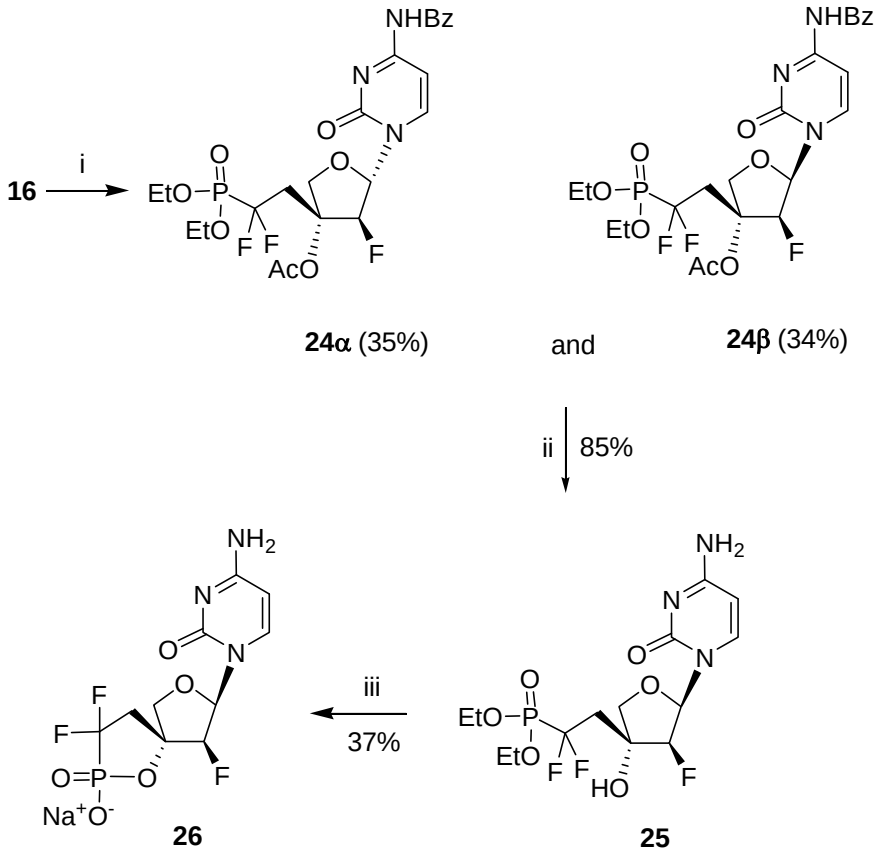


Reagents: i) Silylated 2-fluoro-6-chloropurine, TMSOTf, DCE; ii) NH_3, DME; iii) (a) TMSBr, 2,6-lutidine, CH_3CN; (b) NaOMe, $HSCH_2CH_2OH$, MeOH; (c) C_{18} HPLC, Dowex-Na^+.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Scheme 4. Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl cytosine phosphonic acid analogues

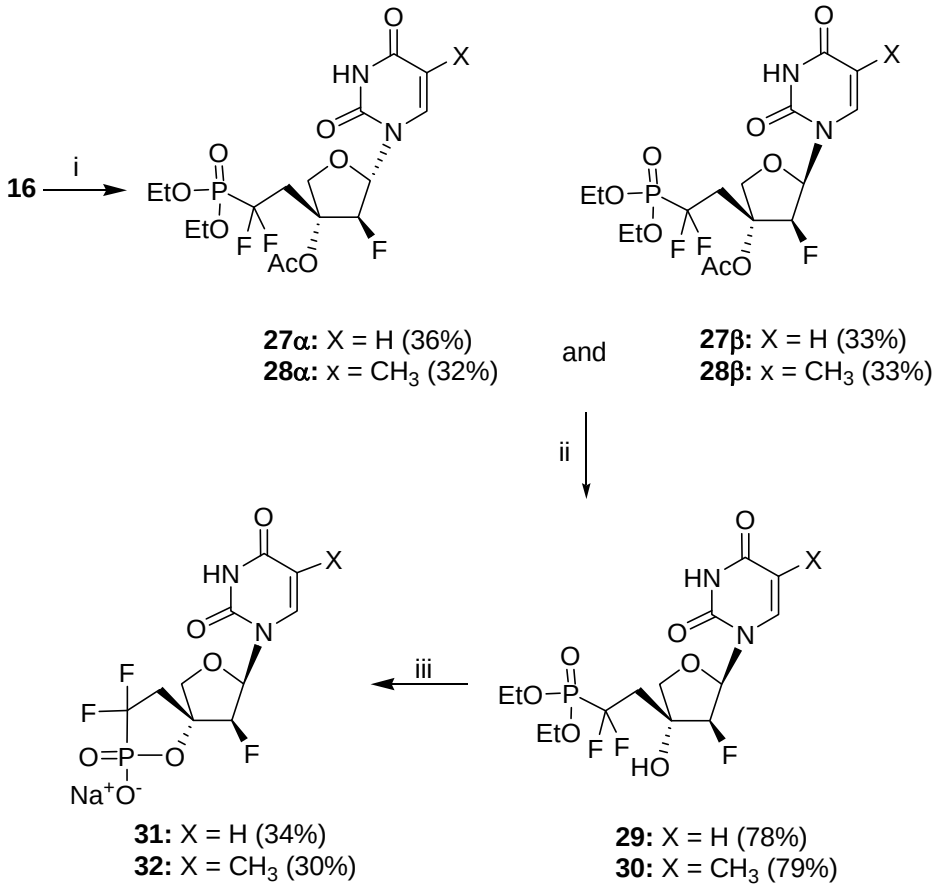


Reagents: i) N_4-Benzoyl cytosine, TMSOTf, DCE; ii) NH_3/MeOH, rt; iii) (a) TMSBr, 2,6-lutidine, CH_3CN; (b) C_{18} HPLC, Dowex-Na^+.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Scheme 5. Synthesis of 2',5',5'-trifluoro-3'-hydroxy-apiosyl uracil and thymine phosphonic acid analogues



Reagents: i) silylated uracil and silylated thymine, TMSOTf, DCE; ii) NH_3, MeOH; iii) (a) TMSBr, 2,6-lutidine, CH_3CN; (b) C_{18} HPLC, Dowex-Na^+.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

합성된 화합물의 항바이러스성 평가는 HIV-1 (PBM cells), HSV-1 (CCL-81 cells), HSV-2 (CCL-81 cells) 그리고 HCMV (AD-169) 와 같은 여러가지 바이러스에 대해 수행하였다. Table 1 에 보이는 바와 같이 합성된 화합물은 아쉽게도 항바이러스에 대한 활성이나 세포독성을 나타내지 않았다. 에피오실 뉴클레오사이드 유도체의 4′ 위치와 3′ 위치 그리고 2′-fluorine 그룹으로부터 히드록시메틸 그룹의 치환이 리보퓨라노스 일부분의 모방을 완벽하게 하지 못했기 때문에 인산화나 DNA 또는 RNA의 합성 저해를 포함한 바이러스 억제 메커니즘이 이 화합물들의 제 기능을 하지 못하게 할 수 있다. 그러나 피리미딘 유도체 29와 30은 Ganciclovir(EC50 = 1.58 μM, in AD-169)와 비교했을때 약한 독성을 가지지만 HCMV에 대해서 강력한 것으로 나타났다(Table 1). 또한 디에틸 포스포네이트 유도체는 일반적으로 시클로모노포스폰산 나트륨 염보다 더 높은 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1: Median effective (EC50) and cytotoxic (CC50) concentrations of the synthesized nucleoside analogues

Compound No.	Anti-HIV-1 EC_{50} (μM)	HSV-1 EC_{50} (μM)	HSV-2 EC_{50} (μM)	HCMV EC_{50} (μM)	Cytotoxicity CC_{50} (μM)
18	>100	>100	>100	>100	>100
19	90	>100	>100	>100	>100
21	>100	80	>100	>100	>100
22	>100	85	>100	>100	>100
23	>100	>100	>100	>100	>100
25	38	>100	>100	>100	>100
26	63	>100	>100	>100	>100
29	>100	>100	>100	11.7	90
30	>100	>100	>100	13.2	90
31	>100	>100	>100	47.3	98
32	>100	>100	>100	29.9	98
AZT	0.0029	ND	ND	ND	>100
GCV	ND	ND	ND	1.3	>10
ACV	ND	0.18	ND	ND	>100
PMEA	1.58	ND	ND	ND	>100

AZT: azidothymidine; **GCV:** Ganciclovir; **ACV:** Acyclovir
PMEA: 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine
CC_{50} (μM): CC_{50} values indicate 50% cytotoxic concentration.
EC_{50} (μM): EC_{50} values are for 50% inhibition of virus production as indicated by supernatant RT levels.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 결 론

요약해보면 본 실험에서는 2′-electronegative 뉴클레오사이드와 Apiosyl 뉴클레오사이드 유도체들의 강력한 항바이러스 활성을 기반으로 하여 1,3-dihydroxyacetone으로부터 새로운 2′,5′,5′-trifluoro-3′-hydroxy-apiose 뉴클레오사이드 포스폰산 유도체를 설계하고 성공적으로 합성했다. 합성된 이들 화합물을 HIV-1, HSV-1, HSV-2 그리고 HCMV와 같은 여러 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 측정해본 결과, Uracil 과 Thymine 유도체인 **29**와 **30**이 HCMV에 대해 상당한 활성을 나타내었다.

이러한 연구 결과로 2′-fluoro-3′-hydroxy 측쇄를 가진 에피오실 포스포네이트 당 부분이 새로운 항 HCMV 제의 개발을 위한 신규 유도체로써 매우 유용할 것이라고 예상된다. 본 연구가 기초가 되어 많은 바이러스에 대한 활발한 연구가 진행되고 우수한 약효를 가진 많은 치료제가 개발되길 기대해 본다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 실험 방법

시약 및 기기 - 본 실험에서 사용된 시약들은 Aldrich 社, Tokyo Kasei 社, Sigma 社 및 Fluka 社에서 구입한 특급과 일급 시약을 사용하였으며 융점 측정은 Mel-temp II를 사용하였으며, 이에 대한 보정은 하지 않았다. NMR(Nuclear magnetic resonance) Spectra는 JEOL 300 Fourier 변환 분광기(JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였다. UV(Ultraviolet) Spectra는 Beckman DU-7 분광 광도계 (Beckman, South Pasadena, CA, USA)를 사용하였고, MS (Mass spectra)는 전기 분무 이온화 (ESI) 모드에서 수집하였다. 원소 분석은 Perkin-Elmer 2400 분석기 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하였다. Silica gel (230-400 mesh)은 Merck 社 제품을 사용하였고, 실험상의 용매들은 필요에 따라 정제하여 사용하였다. TLC(Thin layer chromatography)는 Analtech (7558, Newark, DE, USA) 社에서 구입한 것을 이용하였으며 TLC spot 은 자외선 램프 UVGL-58 과 Anisaldehyde, $KMnO_4$ 발색시약을 사용하였다. 지정하지 않는 한 모든 반응은 질소 기체 하에서 수행하였다. 무수 Dichloromethane, Benzene, 및 Pyridine 은 CaH_2 로부터 증류하여 얻었다. 무수 THF 는 사용하기 직전에 Na 와 Benzophenone 으로부터 즉시 증류하여 얻었다.

(±)-(S)-4-[(t-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-dihydro-4-hydroxyfuran-2(3H)-one (7): TBDMSCl (7.67g, 50.9mmol)을 CH_2Cl_2 (100mL)에 용해하고 화합물 6 (5.6g, 42.4 mmol)과 Imidazole (5.77g, 84.82mmol)을 0°C에서 천천히 첨가하여 동일한 온도에서 7시간 동안 교반한다. 반응 용매를 감압 증발하고 잔여물을 Diethyl ether와 물로 2회 추출한다. 결합된 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조하고 여과 후 감압 농축하여 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:5)로 정제하여 무색 오일 상의 화합물 7 (9.29g, 89%)을 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4.51 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 2.54 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 2.29 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 0.89 (s,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

9H), 0.01 (s, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 174.2, 77.3, 73.9, 71.3, 42.0, 25.6, 18.7, -4.3.

(±)-(S)-4-[(t-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-dihydro-4-(benzhydryloxy)furan-2(3H)-one (8): 락톤 유도체 7 (2.26g, 9.18mmol)을 70°C에서 Acetonitrile (36mL)에 용해하고 Diazo(diphenyl)methane (2.67g, 13.77mmol)을 첨가한다. 반응 혼합물을 18시간 동안 환류 교반한다. 그 시간 동안 혼합물은 보라색에서 노란색으로 변한다. Ph_2CN_2 (1.94g, 10.0mmol)을 추가로 첨가하고 반응액을 16시간 동안 환류 교반한다. TLC를 이용하여 출발 물질이 완전히 반응한 것을 확인한 후 반응 용매를 감압 증발하고 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:25)로 정제하여 화합물 8 (3.10g, 82%)을 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.43-7.18 (m, 10H), 5.78 (s, 1H), 4.53 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.24 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 2.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 2.25 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.02 (s, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 175.3, 129.2, 128.5, 128.2, 127.4, 82.9, 75.1, 71.7, 71.4, 41.0, 25.3, 18.5, -5.2; Anal. Calcd. for $C_{24}H_{32}O_4Si$: C, 69.86; H, 7.82. Found: C, 69.72; H, 7.73; MS m/z 413 $(M + H)^+$.

(rel)-(3R,4S)-4-[(t-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-dihydro-3-fluoro-4-(benzhydryloxy)furan-2(3H)-one (9a) and (rel)-(3S,4S)-4-[(t-butyldimethylsilyloxy)methyl]-dihydro-3-fluoro-4-(benzhydryloxy)furan-2(3H)-one (9b): NFSI (0.763g, 2.43mmol)을 무수 THF (10mL)에 용해하고 락톤 유도체 8 (1.0g, 2.43mmol)을 첨가한 후 -78°C로 냉각한다. LiHMDS (2.93mL, 1.0M solution in THF)을 1.2시간 동안 천천히 Dropwise 하고 반응 용액을 -78°C에서 추가로 5시간 동안 교반한 후 2시간 동안은 상온에서 교반하였다. 반응액에 포화 NH_4Cl (1.0mL)와 Diethyl ether (80mL)로 희석하고 동일한 양의 포화 $NaHCO_3$를 부가함으로써 반응을 종결한다. 유기층을 포화 $NaHCO_3$로 2회, brine으로 1회 씻어낸 뒤 무수 $MgSO_4$로 건조하고 여과한 후 감압 농축한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc, 25:1)로 정제하여

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

화합물 9a (345mg, 33%)와 9b (313mg, 30%)을 얻는다. Data for compound 9a: ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40-7.19 (m, 10H), 5.69 (s, 1H), 4.55 (d, J = 7.6 Hz, 1.0H), 4.34 (d, J = 48.0 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 7.7 Hz, 1.0H), 4.04 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.75 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); Anal. Calcd. for $C_{24}H_{31}FO_4Si$: C, 66.95; H, 7.26; found: C, 66.83; H, 7.36; MS m/z 431 $(M+H)^+$. Data for compound 9b: ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.39-7.17 (m, 10H), 5.72 (s, 1H), 4.50 (d, J = 7.8 Hz, 1.0H), 4.32 (d, J = 46.2 Hz, 1.0H), 4.20 (d, J = 7.8 Hz, 1.0H), 4.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.03 (s, 6H); Anal. Calcd. for $C_{24}H_{31}FO_4Si$: C, 66.95; H, 7.26; found: C, 67.07; H, 7.20; MS m/z 431 $(M+H)^+$.

(rel)-(1S/1R,2S,3S)-3-[(t-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-3-(benzhydryloxy)-2-fluoro-tetrahydrofuran-1-ol (10): Toluene (26mL)에 화합물 9 (946mg, 2.2mmol)를 용해하고 –78 °C에서 1시간 동안 DIBAL-H (1.0M solution in hexane 3.3mL)로 처리한다. 반응액에 MeOH (1.5mL)을 첨가하여 2시간 동안 상온에서 교반하여 온도를 올리고 EtOAc (80mL)를 부가함으로써 반응을 종결한다. 반응 혼합물을 여과 후 감압 농축하고 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:10)로 정제하여 이성질체 형태의 화합물 10 (827mg, 87%)을 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.42-7.19 (m, 10H), 5.78 (d, J = 16.8 Hz, 0.5H), 5.65 (d, J = 13.6 Hz, 0.5H), 5.40 (s, 1H), 4.08-3.98 (m, 2.5H), 3.86-3.79 (m, 2.5H), 0.89 (m, 9H), 0.02 (m, 6H); Anal. Calcd. for $C_{24}H_{33}FO_4Si$: C, 66.63; H, 7.69. Found: C, 66.56; H, 7.71; MS m/z 433$(M + H)^+$.

(rel)-(1S/1R,2S,3S)-3-[(t-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-3-(benzhydryloxy)-2-fluoro-tetrahydro-1-methoxyfuran (11): 락톨 10 (1.68g, 3.9mmol)을 무수 Diethyl ether (12.6mL)에 용해하고 무수 분말화된 분자체 (4Å, 90mg)를 첨가한다. 교반하면서 Trimethyl orthoformate (0.81mL, 7.2mmol) 과 $BF_3{\cdot}OEt_2$ (112.2μL)를 첨가하고 50분 동안 교반한다. 반응액에 Et_3N 과 Brine을 흐릿할 때까지 부가함으로써 반응을 종결한다. 반응 혼합물을 Diethyl ether로 추출하고 무수 $MgSO_4$로 건조하고 감압 농축한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(EtOAc/hexane, 1:20)로 정제하여 이성질체 형태의 화합물 11 (1.55g, 0.89%)을 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.39-7.17 (m, 10H), 5.65 (s, 1H), 5.40 (dd, J = 13.6, 8.0 Hz, 1H), 5.32 (m, 0.5 H), 5.27 (dd, J = 46.0, 12.6 Hz, 0.5H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.77-3.68 (m, 2H), 3.26 (s, s, 3H), 0.89 (m, 9H), 0.02 (m, 6H); Anal. Calcd. for $C_{25}H_{35}FO_4Si$: C, 67.23; H, 7.90. Found: C, 67.36; H, 7.84; MS m/z 447 $(M + H)^+$.

(rel)-(1S/1R,2S,3R)-3-(Benzhydryloxy)-2-fluoro-tetrahydro-1-methoxyfuran-3-yl)methanol (12): 화합물 11 (506mg, 1.13mmol)을 THF (14mL)에 용해하고 0°C에서 TBAF (1.54mL, 1.0M solution in THF)를 첨가한다. 반응 혼합물을 상온에서 8시간 동안 교반하고 감압 농축한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:5)로 정제하여 이성질체 형태의 화합물 12 (345mg, 92%)를 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.41-7.20 (m, 10H), 5.69 (s, 1H), 5.39 (d, J = 12.4 Hz, 0.5H), 5.32 (d, J = 13.2 Hz, 0.5H), 5.30 (dd, J = 48.4, 13.3 Hz, 0.5 H), 5.24 (m, 0.5H), 4.05-3.98 (m, 2H), 3.79-3.71 (m, 2H), 3.24 (s, s, 3H); Anal. Calcd. for $C_{19}H_{21}FO_4$: C, 68.66; H, 6.37. Found: C, 68.54; H, 6.29; MS m/z 333 $(M + H)^+$.

(rel)-(1S/1R,2S,3S)-(3-(Benzhydryloxy)-2-fluoro-tetrahydro-1-methoxyfuran-3-yl) methyl trifluoromethanesulfonate (13): Pyridine (0.65mL, 7.56mmol)을 CH_2Cl_2 (25mL)에 용해하고 –78°C에서 글리코시드 12 (501mg, 1.51mmol)를 첨가한 후 Triflic anhydride (510mg, 1.81mmol)를 천천히 부가한다. 3시간 동안 교반한 후에 반응 혼합물을 Ice 와 Sodium hydrogen carbonate의 혼합물에 부어준다. 수층을 CH_2Cl_2 (3 x 50mL)로 추출하고 결합된 CH_2Cl_2 용액을 무수 $MgSO_4$로 건조하여 잔여 Pyridine을 제거하기 위해 Toluene으로 신속하게 여러 차례 농축하였다. 잔여물을 Light petroleum (3 x 50mL)로 추출하고 여과한 후 냉각한다. 반응 용매를 조심스럽게 감압 증발하고 그대로의 잔여물을 화합물 13 (693mg, ~99%)으로 하고 추가 정제 없이 다음 반응에 사용한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(1S/1R,2S,3R)-(Diethyl 5,5-difluoro-3-(benzhydryloxy)-2-fluoro-tetrahydro-1-methoxyfuran-3-yl) ethylphosphonate (14): Diisopropylamine (262μL, 1.87mmol)과 HMPA (325μL, 1.87mmol)를 –78°C에서 아르곤 가스 상태하에 THF (5mL)에 용해하고 *n*-butyllithium (1.17mL of a 1.6M solution in hexane, 3.12mmol)를 첨가한다. 반응액을 0°C에서 30분 동안 교반하고 –78°C로 냉각한다. –78°C에서 LDA 용액을 Cannula를 이용해서 첨가하고 THF (2.0mL)에 Diethyl (α,α-difluoromethyl) Phosphonate (351mg, 1.87mmol)를 용해하고 3분 후 트리플레이트 13 (248mg, 0.536mmol)을 THF (2.0mL)에 Cannula를 이용해서 Dropwise 한다. 10분 후에 –78°C에서 반응액에 수용액 NH_4Cl (12.0mL)과 Et_2O (12.0mL)을 부가함으로써 반응을 종결한다. 수층을 EtOAc (2 x 50mL)로 추출하고 유기 추출물을 무수 $MgSO_4$로 건조하여 여과한 후 감압 증발한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:2)로 정제하여 결정 형태의 화합물 14 (158mg, 59%)를 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40-7.21 (m, 10H), 5.70 (s, 1H), 5.39 (d, J = 12.6 Hz, 0.5H), 5.36 (d, J = 13.4 Hz, 0.5H), 4.29 (dd, J = 47.8, 12.6 Hz, 0.5H), 4.24 (dd, J = 46.6, 13.4 Hz, 0.5H), 4.17 (m, 4H), 3.97-3.79 (m, 2H), 3.25, 3.24 (s, s, 3H), 2.42-2.37 (m, 2H), 1.18-1.17 (m, 6H); Anal. Calcd. for $C_{24}H_{30}F_3O_6P$: C, 57.37; H, 6.02. Found: C, 57.44; H, 5.97; MS m/z 503 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1S/1R,2S,3R)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydro-1-methoxyfuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (15): 메틸 글리코시드 14 (201mg, 0.6mmol)를 Ethanol (72mL)에 용해하고 1 기압의 수소 기체 상태하에 5시간 동안 10% Palladium-on carbon (72mg)을 혼합한다. 여과하여 촉매를 제거하고 반응 용매를 감압 증발한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:1)로 정제하여 시럽 형태의 화합물 15 (169mg, 84%)를 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5.39 (d, J = 13.6 Hz, 0.5H), 5.31 (d, J = 14.0 Hz, 0.5H), 4.28-4.23 (m, 4.5H), 3.95 (dd, J = 14.0, 7.8 Hz, 1.5H), 3.75-3.69 (dd, J = 8.0, 6.6 Hz, 1H), 3.25, 3.24 (s, s, 3H), 2.67-2.56 (m, 2H), 1.26-1.24 (m, 6H); Anal. Calcd. for $C_{11}H_{20}F_3O_6P$: C, 39.29; H, 6.00. Found: C, 39.40; H, 6.06; MS m/z 337 $(M + H)^+$.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(rel)-Diethyl 4-[(1S/1R,2S,3R)-1,3-diacetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (16): 글리코시드15 (580mg, 1.728mmol)를 EtOAc (14.4mL)에 용해하고 -10°C에서 EtOAc (28mL), Acetic anhydride (16mL), Acetic acid (12.0mL) 그리고 진한 H_2SO_4 (0.072mL)를 첨가한 후 상온에서 22시간 동안 교반한다. 반응액을 $CHCl_3$ (100mL)에 희석하고 차가운 5%의 수용액 $NaHCO_3$ (180mL)을 부어준다. 유기층을 분리하고 수층은 $CHCl_3$ (3 x 36mL)로 추출한다. 결합된 유기층을 Brine로 씻어내고 무수 $MgSO_4$로 건조하여 감압 증발하였다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane, 1:4)로 정제하여 결정 형태의 화합물 16 (596mg, 85%)을 얻는다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6.52 (d, J = 13.6 Hz, 0.5H), 6.45 (d, J = 11.8 Hz, 0.5H), 4.26-4.20 (m, 4H), 4.82 (dd, J = 46.8, 13.6 Hz, 0.5H), 4.70 (dd, J = 50.2, 11.8 Hz, 0.5H), 4.16-4.12 (dd, J = 10.8, 9.4 Hz, 1H), 3.80 (dd, J = 11.6, 8.4 Hz, 1.0Hz), 2.76-2.63 (m, 2H), 2.02-2.00 (s,s,s,s, 6H), 1.24-1.19(m, 6H); Anal. Calcd. for $C_{14}H_{22}F_3O_8P$: C, 41.39; H, 5.46. Found: C, 41.43; H, 5.53; MS m/z 407 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1S,2S,3R)-1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate(17α) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (17β): 6-Chloropurine (315mg, 2.04mmol)를 무수 HMDS (18mL)에 용해하고 촉매인 Ammonium sulfate (20mg)를 첨가하여 깨끗해질 때까지 15시간 동안 환류한다. 반응 용매를 무수 상태하에 증류하고 잔여물을 무수 1,2-dichloroethane (15mL)에 용해한다. 반응 혼합물과 화합물 16 (414mg, 1.02mmol)을 무수 DCE (15mL)에 용해하고 TMSOTf (453mg, 2.04mmol)를 첨가한 후 상온에서 6시간 동안 교반한다. 반응액에 포화 $NaHCO_3$ (15mL)를 부가하고 2시간 동안 교반한 후 Celite pad를 이용해 여과한다. 잔여물을 CH_2Cl_2 (2x140mL)로 2회 추출하고 결합된 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조하여 여과한 후 진공상태에서 감압 농축한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography (EtOAc/hexane/MeOH, 4:1:0.02)로 정제하여 각각의 화합물 17α

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(153mg, 30%)와 17β (158mg, 31%)를 얻는다. Data for 17α: 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.68 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 6.20 (dd, J = 13.7, 8.6 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 48.4, 8.6 Hz, 1H), 4.28-4.25 (m, 4H), 4.10 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 2.78 (ddd, J = 8.2, 12.8, 14.6 Hz, 1H), 2.62 (ddd, J = 8.2, 13.4, 14.0 Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.27-1.26 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (t, $J_{P,F}$ = 105.6 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{21}ClF_3N_4O_6P$: C, 40.77; H, 4.23; N, 11.19. Found: C, 40.64; H, 4.35; N, 11.28; MS m/z 501 $(M + H)^+$; Data for 17β: ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.71 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.17 (dd, J = 15.8, 7.8 Hz, 1H), 4.32 (dd, J = 51.2, 7.8 Hz, 1H), 4.27-4.25 (m, 4H), 4.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 2.81 (ddd, J = 8.0, 11.8, 13.8 Hz, 1H), 2.69 (ddd, J = 8.0, 12.0, 14.2 Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.27-1.25 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (t, $J_{P,F}$ = 104.8 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{21}ClF_3N_4O_6P$: C, 40.77; H, 4.23; N, 11.19. Found: C, 40.86; H, 4.19; N, 11.12; MS m/z 501 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl phosphonate (18): 화합물 17β (379mg, 0.758mmol)를 64°C에서 포화 Methanolic ammonia (10mL)에 용해하고 밤새도록 교반한 후 휘발성 용매는 감압 증발한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1:10)로 정제하여 백색 고체상의 화합물 18 (219mg, 66%)을 얻는다. UV (MeOH) λ_{max} 261.0 nm; ^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 8.40 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.41 (br s, 2H, D_2O exchangeable), 6.19 (dd, J = 15.2, 7.6 Hz, 1H), 5.10 (s, 1H, D_2O exchangeable), 4.29-4.27 (m, 4H), 3.97-3.94 (m, 1.5H), 3.76-3.72 (dd, J = 12.8, 10.2 Hz, 1.5H), 2.76-2.58 (m, 2H), 1.31-1.28 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.67 (app t, $J_{P,F}$ = 101.8 Hz); Anal. Calc. for $C_{15}H_{21}F_3N_5O_5P$ (+1.0 MeOH): C, 40.78; H, 5.35; N, 14.86; Found: C, 40.92; H, 5.27; N, 14.78; MS m/z 440 $(M + H)^+$.

(rel)-4-[(1R,2S,3R)-1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl-3,6-cyclomonophosphonic acid sodium salt (19): 화합물 18

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(140mg, 0.32mmol)과 2,6-lutidine (2.3mL, 19.2mmol)를 무수 CH_3CN (22mL)에 용해하고 상온의 질소 기체 상태하에 Bromotrimethylsilane (979mg, 6.4mmol)를 첨가한다. 반응 혼합물은 30시간 동안 환류한 후 상온의 진공상태에서 감압 농축하고 잔여물을 MeOH과 0.5M TEAB 용액으로 감압 증발한다. Reverse phase C_{18}과 Dowex-Na^+ 수지의 이온교환을 이용한 HPLC로 정제하고 동결 건조하여 무색 고체상의 나트륨 염 19 (42mg, 34%)를 얻는다. ^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) δ 8.39 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.21 (dd, J = 14.6, 6.8 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.92-3.81 (m, 2H), 2.66-2.52 (m, 2H); ^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) δ 156.7, 153.0, 149.7, 140.5, 129.3 (dt, J = 217.2, 265.6 Hz), 119.6, 101.4 (d, J = 212.6 Hz), 82.9 (d, J = 20.8 Hz), 76.4, 72.5 (d, J = 19.7 Hz), 33.2 (dd, J = 25.4, 19.2 Hz); ^{31}P (121.5 MHz, D_2O) δ 4.21 (dd, $J_{P,F}$ = 101.8, 90.4 Hz); HPLC t_R = 10.56; HRMS $[M-H]^+$ req. 364.0753, found 364.0751.

(rel)-Diethyl 4-[(1S,2S,3R)-1-(2-fluoro-6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (20α) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2-fluoro-6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (20β): 화합물 17α와 17β에 대해 기재한 것과 같이 Vorbrüggen 축합 조건 하에 2-fluoro-6-chloropurine과 화합물 16을 축합한 것과 유사한 과정으로 각각의 20α와 20β를 얻는다. Data for 20α: yield 33%; UV (MeOH) λ_{max} 268.5 nm; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 6.16 (dd, J = 13.6, 7.2 Hz, 1H), 4.30 (m, 4H), 4.22 (dd, J = 48.2, 7.2 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 3.81 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 2.73-2.61 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.25 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (t, $J_{P,F}$ = 103.6 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{20}ClF_4N_4O_6P$: C, 39.36; H, 3.89; N, 10.80; Found: C, 39.47; H, 3.75; N, 10.73; MS m/z 519 $(M + H)^+$. Data for 20β: yield 32%; UV (MeOH) λ_{max} 269.0 nm; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.27 (s, 1H), 6.08 (dd, J = 12.5, 8.6 Hz, 1H), 4.31 (m, 4H), 4.21 (dd, J = 45.8, 8.6 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 2.77-2.63 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.28-1.27 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7.49 (t, $J_{P,F}$ = 104.7 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{20}ClF_4N_4O_6P$: C, 39.36; H, 3.89; N, 10.80; Found: C, 39.24; H, 3.82; N, 10.86; MS m/z 519 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2-fluoro-6-amino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (21) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (22): 무수 암모니아 가스 상태하에 상온에서 20β (544mg, 1.05mmol)를 DME (15.0mL)에 용해하고 밤새도록 교반한다. 여과하여 염을 제거하고 여과액을 감압 농축한다. 잔여물을 Silica gel column chromatography ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1:10)로 정제하여 화합물 21 (62mg, 13%)과 22 (203mg, 41%)를 얻는다. Data for 21; UV (MeOH) λ_{max} 260.5 nm; ^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) 8.30 (s, 1H), 7.74 (br s, NH_2, 2H, D_2O exchangeable), 6.13 (dd, J = 14.2, 7.8 Hz, 1H), 5.11 (s, H, D_2O exchangeable), 4.30 (m, 4H), 3.98-3.96 (m, 1.5H), 3.78-3.76 (m, 1.5H), 2.75-2.64 (m, 2H), 1.32 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.36 (t, $J_{P,F}$ = 105.8 Hz); Anal. Calc. for $C_{15}H_{20}F_4N_5O_5P$ (+1.0 MeOH): C, 39.28; H, 4.94; N, 14.31; Found: C, 39.24; H, 4.85; N, 14.30; MS m/z 458 $(M + H)^+$. Data for 22; UV (MeOH) λ_{max} 308.0 nm; ^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) 8.16 (s, 1H), 7.67 (br s, NH_2, 2H, D_2O exchangeable), 6.09 (dd, J = 14.5, 8.8 Hz, 1H), 5.14 (s, 1H, D_2O exchangeable), 4.32 (m, 4H), 3.95-3.91 (m, 1.5H), 3.79-3.75 (m, 1.5H), 2.80-2.66 (m, 2H), 1.30 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.32 (t, $J_{P,F}$ = 107.2 Hz); Anal. Calc. for $C_{15}H_{20}ClF_3N_5O_5P$ (+1.0 MeOH): C, 38.04; H, 4.79; N, 13.86; Found: C, 37.97; H, 4.69; N, 13.80; MS m/z 474 $(M + H)^+$.

(rel)-4-[(1R,2S,3R)-1-(2-Amino-6-oxo-9H-purin-9-yl)-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl-3,6-cyclomonophosphonic acid sodium salt(23): 화합물 22 (274mg, 0.58mmol)와 2,6-lutidine (4.05mL, 34.8mmol)를 무수 CH_3CN (23.2mL)에 용해하고 상온에서 Trimethylsilyl bromide (1.77g, 11.6mmol)를 첨가한다. 반응 혼합물을 30시간 동안 교반하고 반응 용매를 MeOH로 3회 감압 증발하여

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제거한다. 잔여물을 MeOH (23.2mL)에 용해하고 2-mercaptoethanol (181mg, 2.32mmol)과 NaOMe (125mg, 2.32mmol)을 첨가한 후 질소 기체 상태하에 18시간 동안 환류한다. 반응 혼합물을 냉각하고 차가운 AcOH로 중화한 후 진공상태에서 증발 건조하고 Methanol을 이용해서 감압 증발한다. Reverse phase C_{18}과 Dowex-Na^+ 수지의 이온교환을 이용한 HPLC로 정제하고 동결 건조하여 무색 고체상의 나트륨 염 23 (79mg, 34%)을 얻는다. ^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz), 7.97 (s, 1H), 6.18 (dd, J = 13.6, 8.8 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.96 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.76 (dd, J = 49.4, 8.8 Hz, 1H), 2.78-2.61 (m, 2H); ^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) δ 157.6, 154.4, 152.1, 136.4, 131.4 (dt, J = 214.8, 262.6, Hz), 103.5 (d, J = 208 Hz), 77.2, 73.6 (d, J = 20.6 Hz), 70.9 (d, J = 19.2 Hz), 32.1 (dd, J = 23,2, 18.8 Hz); ^{31}P (121.5 MHz, D_2O) δ 3.58 (dd, $J_{P,F}$ = 107.4, 82.2 Hz); HPLC t_R = 10.35 min; HRMS $[M-H]^+$ req. 380.0563, found 380.0561.

(rel)-Diethyl 4-[(1S,2S,3R)-1-(N_4-benzoylamino-2-oxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (24α) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(N_4-benzoylamino-2-oxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (24β): 화합물 17α와 17β에 대해 기재한 것과 같이 Vorbrüggen 축합 조건 하에 N_4-benzoyl cytosine과 화합물 16을 축합한 것과 유사한 과정으로 고체상의 화합물 각각의 24α와 24β를 얻는다. Data for 24α: yield 35%; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.18 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.02-7.98 (m, 2H), 7.63-7.51 (m, 4H), 6.10 (dd, J = 13.6, 9.0 Hz), 4.74 (dd, J = 47.8, 9.0 Hz, 1H), 4.30 (m, 4H), 4.03 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 3.84 (d, J = 10.8 Hz), 2.77-2.63 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.31 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42 (t, $J_{P,F}$ = 105.6 Hz); Anal. Calc. for $C_{23}H_{27}F_3N_3O_8P$: C, 49.20; H, 4.85; N, 7.48; Found: C, 49.11; H, 4.79; N, 7.53; MS m/z 562 $(M + H)^+$. Data for 24β: yield 34%; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.20 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.02-7.97 (m, 2H), 7.64-7.53 (m, 4H), 6.13 (dd, J = 14.4, 8.4 Hz), 4.65 (dd, J = 46.6, 8.4 Hz, 1H), 4.29-4.27 (m, 4H), 4.07 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.88 (d, J = 9.6 Hz), 2.74-2.60 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.28-1.27

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (t, $J_{P,F}$ = 107.0 Hz); Anal. Calc. for $C_{23}H_{27}F_3N_3O_8P$: C, 49.20; H, 4.85; N, 7.48; Found: C, 49.28; H, 4.91; N, 7.43; MS m/z 562 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(4-amino-2-oxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (25): 포화 Methanolic ammonia (20mL)에 화합물 24β (594mg, 1.06mmol)를 용해하고 상온에서 밤새도록 교반한다. 반응 용매를 감압 증발한 후 잔여물을 Silica gel column chromatography (MeOH/CH_2Cl_2, 1:10)로 정제하여 백색 고체상의 화합물 25 (374 mg, 85%)를 얻는다. UV (MeOH) λ_{max} 271.0 nm; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 7.85 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.26 (br d, 2H, D_2O exchangeable), 6.09 (d, J = 13.6, 8.4 Hz, 1H), 5.74 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 5.14 (s, 1H, D_2O exchangeable), 4.39 (dd, J = 48.6, 8.4 Hz), 4.22 (m, 4H), 3.97 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 2.79-2.65 (m, 2H), 1.29-1.28 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 3.63 (t, $J_{P,F}$ = 89.2 Hz); Anal. Calc. for $C_{14}H_{21}F_3N_3O_6P$ (+1.0 MeOH): C, 40.29; H, 5.63; N, 9.39; Found: C, 40.37; H, 5.53; N, 9.27; MS m/z 416 $(M + H)^+$.

(rel)-4-[(1R,2S,3R)-1-(4-Amino-2-oxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl-3,6-cyclomonophosphonic acid sodium salt(26): 화합물 19의 합성법에 대해 기재한 것과 유사한 과정으로 화합물 25로부터 최종 Cytosine 유도체 26을 합성한다. Yield 37%; UV (H2O) λmax 272.0 nm; 1H NMR (D_2O, 300 MHz), 7.68 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 6.07 (dd, J = 14.4, 8.6 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 46.6, 8.6 Hz), 4.12 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 2.76-2.59 (m, 3H); ^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) δ 165.6, 155.5, 141.5, 130.7 (dt, J = 210.8, 264.0 Hz), 102.7 (d, J = 208.5 Hz), 93.9, 80.6 (d, J = 20.8 Hz), 76.3, 72.2 (d, J = 18.6 Hz), 30.4 (dd, J = 23.6, 19.7 Hz); ^{31}P (121.5 MHz, D_2O) δ 4.13 (t, $J_{P,F}$ = 89.4 Hz); HPLC t_R = 10.38 min; HRMS $[M-H]^+$ req. 340.0732, found 340.0730.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(rel)-Diethyl 4-[(1S,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (27α) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (27β): 6-chloropurine 유도체 17α과 17β의 합성법에 대해 기재한 것과 같이 Vorbrüggen 축합 조건 하에 유사한 과정으로 Uracil 유도체를 합성한다. Data for 27α: yield 36%; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.24 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.76 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.09 (dd, J = 14.8, 8.0 Hz, 1H), 5.63 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.75 (dd, J = 50.2, 8.0 Hz), 4.26-4.25 (m, 4H), 4.10 (dd, J = 9.8 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 2.80-2.68 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.30-1.29 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.76 (t, $J_{P,F}$ = 103.5 Hz); Anal. Calc. for $C_{16}H_{22}F_3N_2O_8P$: C, 41.93; H, 4.84; N, 6.11; Found: C, 41.86; H, 4.75; N, 6.20; MS m/z 459 $(M + H)^+$. Data for 27β: yield 33%; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.26 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.78 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.12 (dd, J = 13.2, 8.4 Hz, 1H), 5.67 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.71 (dd, J = 47.6, 8.4 Hz), 4.28 (m, 4H), 4.07 (dd, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 2.78-2.59 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.30 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.79 (t, $J_{P,F}$ = 104.7 Hz); Anal. Calc. for $C_{16}H_{22}F_3N_2O_8P$: C, 41.93; H, 4.84; N, 6.11; Found: C, 41.81; H, 4.92; N, 6.04; MS m/z 459 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1S,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-5-methyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (28α) and (rel)-diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-5-methyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-acetoxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (28β): 6-chloropurine 유도체 17α과 17β의 합성법에 대해 기재한 것과 같이 Vorbrüggen 축합 조건 하에 유사한 과정으로 Thymine 유도체를 합성한다. Data for 28α: yield 32%; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.17 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.70 (s, 1H), 6.10 (dd, J = 13.5, 8.6 Hz, 1H), 4.75 (dd, J = 47.6, 8.6 Hz), 4.26 (m, 4H), 4.05 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 2.83-2.70 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.29-1.28 (m, 6H); ^{31}P (121.5

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

MHz, DMSO-d_6) δ 7.52 (t, $J_{P,F}$ = 108.3 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{24}F_3N_2O_8P$: C, 43.23; H, 5.12; N, 5.93; Found: C, 43.17; H, 5.17; N, 5.83; MS m/z 473 $(M + H)^+$. Data for 28β: yield 33%; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.19 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.73 (s, 1H), 6.07 (dd, J = 13.0, 9.2 Hz, 1H), 4.81 (dd, J = 48.4, 9.2 Hz), 4.29-4.28 (m, 4H), 4.09 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.85 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 2.79-2.63 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.31-1.30 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.55 (t, $J_{P,F}$ = 106.7 Hz); Anal. Calc. for $C_{17}H_{24}F_3N_2O_8P$: C, 43.23; H, 5.12; N, 5.93; Found: C, 43.36; H, 5.06; N, 6.02; MS m/z 473 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (29):
화합물 24의 합성법에 대해 기재한 것과 유사한 과정으로 27β의 Methanolysis를 수행한다. Yield 78%; 1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.24 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.80 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.13 (dd, J = 14.6, 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H, D_2O exchangeable), 4.46 (dd, J = 46.8, 8.4 Hz), 4.21 (m, 4H), 4.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.75 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 2.77-2.61 (m, 2H), 1.28-1.27 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.56 (t, $J_{P,F}$ = 109.1 Hz); Anal. Calc. for $C_{14}H_{20}F_3N_2O_7P$ (+1.0 MeOH): C, 40.20; H, 5.39; N, 6.25; Found: C, 40.22; H, 4.25; N, 6.28; MS m/z 417 $(M + H)^+$.

(rel)-Diethyl 4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-dioxo-5-methyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxy-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethylphosphonate (30):
화합물 29의 합성법에 대해 기재한 것과 동일한 조건으로 화합물 28β로부터 Thymine 유도체 30을 합성한다. Yield 79%; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 11.15 (br s, 1H, D_2O exchangeable), 7.71 (s, 1H), 6.08 (dd, J = 14.6, 8.0 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 46.4, 8.0 Hz), 4.23-4.22 (m, 4H), 3.98 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 2.75-2.61 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.29-1.28 (m, 6H); ^{31}P (121.5 MHz, DMSO-d_6) δ 7.49 (t, $J_{P,F}$ = 105.4 Hz); Anal. Calc. for $C_{15}H_{22}F_3N_2O_7P$ (+1.0 MeOH): C, 41.58; H, 5.67; N, 6.06; Found: C, 41.67; H, 5.74; N, 5.98; MS m/z 431 $(M + H)^+$.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(rel)-4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl-3,6-cyclomonophosphonic acid sodium salt (31): 화합물 19의 합성법에 대해 기재한 것과 유사한 가수분해 조건으로 화합물 29로부터 Uracil cyclomonophosphonic acid 유도체 31을 합성한다. Yield 34%; UV (H_2O) λ_{max} 261.5 nm; ^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz), 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 13.8, 8.6 Hz, 1H), 5.75 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 46.5, 8.6 Hz), 4.09 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 2.81-2.69 (m, 2H); ^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) δ 166.7, 152.2, 142.5, 130.7 (dt, J = 209.2, 265.2 Hz), 102.9 (d, J = 209.4 Hz), 80.3 (d, J = 21.4 Hz), 76.1, 72.5 (d, J = 18.7 Hz), 30.3 (dd, J = 21.4, 19.2 Hz); ^{31}P (121.5 MHz, D_2O) δ 4.12 (t, $J_{P,F}$ = 88.4 Hz); HPLC t_R = 10.61 min; HRMS $[M-H]^+$ req. 341.0534, found 341.0532.

(rel)-4-[(1R,2S,3R)-1-(2,4-Dioxo-5-methyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2-fluoro-tetrahydrofuran-3-yl]-5,5-difluoroethyl-3,6-cyclomonophosphonic acid sodium salt (32): 화합물 19의 합성법에 대해 기재한 것과 유사한 가수분해 조건으로 화합물 30로부터 Thymine 유도체 32를 합성한다. Yield 30%; UV (H_2O) λ_{max} 267.0 nm; ^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz), 7.70 (s, 1H), 6.11 (dd, J = 14.2, 8.4 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 49.4, 8.4 Hz), 4.12 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 2.86-2.71 (m, 2H), 1.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) δ 164.2, 150.8, 136.7, 131.6 (dt, J = 210.4, 262.6 Hz), 109.7, 102.5 (d, J = 216.8 Hz), 80.4 (d, J = 22.5 Hz), 76.3, 72.8 (d, J = 20.4 Hz), 31.7 (dd, J = 21.6, 19.2 Hz), 12.8; ^{31}P (121.5 MHz, D_2O) δ 4.32 (t, $J_{P,F}$ = 83.8 Hz); HPLC t_R = 10.72 min; HRMS $[M-H]^+$ req. 355.0753, found 355.0750.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. (a) Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C. K. Fluorinated nucleosides: synthesis and biological implication. *J. Fluorine. Chem*. **2008**, 129, 743-766; (b) Wojtowicz-Raichel, H. Synthesis and application of fluorinated nucleoside analogues. *J. Fluorine Chem*. **2012**, 143, 11-48; (c) Qiu, X.-L.; Xu, X.-H.; Qing, F.-L. Recent advances in the synthesis of fluorinated nucleosides. *Tetrahedron* **2010**, 66, 789-843.
2. Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. L-2′,3′-Didehydro-2′,3′-dideoxy-3′-fluoronucleosides: Synthesis, anti-HIV activity, chemical and enzymatic stability, and mechanism of resistance. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3245-3256.
3. (a) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs. *Chem. Rev*. **2014**, 114, 9154-9218; (b) Engel, R. Phosphonates as analogues of natural phosphates. *Chem. Rev*. **1977**, 77, 349-367; (c) Baszczyňski, O.; Janeba, Z. Medicinal chemistry of fluorinated cyclic and acyclic nucleoside phosphonates. *Med. Chem. Rev*. **2013**, 33, 1304-1344; (d) De Clercq, E. The Holy Trinity: the acyclic nucleoside phosphonates. *Adv. Pharmacol*. **2013**, 67, 293-316.
4. (a) Blackburn, G. M.; Kent, D. E. Synthesis of α- and γ-fluoroalkylphosphonates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986,** 913-917; (b) Thatcher, G. R. J.; Campbell, A. S. Phosphonates as mimics of phosphate biomolecules: ab initio calculations on tetrahedral ground states and pentacoordinate intermediates for phosphoryl transfer. *J. Org. Chem*. **1993**, 58, 2272-2281; (c) Burke, T. R Jr.; Smyth, M. S.; Otaka, A.; Nomizu, M.; Roller, P. P.; Wolf, G.; Case, R.; Shoelson, S. E. Nonhydrolyzable phosphotyrosyl mimetics for the preparation of phosphatase-resistant SH2 domain inhibitors. *Biochemistry* **1994**, 33, 6490-6494
5. (a) Chambers, R. D.; Jaouhari, R.; O'Hagan, D. The preparation of difluoromethylenephosphonate analogues of glycolytic phosphates. Approaching an isosteric and isoelectronic phosphate mimic. *Tetrahedron* **1989**, 45, 5101-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5108; (b) Berkowitz, D. B.; Eggen, H. J.; Shen, Q.; Shoemaker, R. K. Ready access to fluorinated phosphonate mimics of secondary phosphates. Synthesis of the (α,α-difluoroalkyl) phosphonate analogues of L-phosphoserine, L-phosphoallothreonine, and L-phosphothreonine. *J. Org. Chem*. **1996**, 91, 4666-4675; (c) Burton, D. J.; Yang, Z.-Y.; Qiu, W. Fluorinated ylides and related compounds. *Chem. Rev*. **1996**, 96, 1641-1715.

6. (a) Krenisky, T. A. Purine nucleoside phosphorylase: kinetics, mechansim, and specificity. *Mol. Pharmacol*. **1967**, 3, 526-536; (b) Pogosian, L. G.; Akopian, Z. Purine nucleoside phosphorylase. *Biomed. Khim*. **2013**, 59, 483-497; (c) Grunebaum, E.; Cohen, A.; Roifman, C. M. Recent advances in understanding and managing adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, 13, 630-638.
7. Markert, M. L. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodefic. Rev*. **1991**, 3, 45-81.
8. (a) Stoeckler, J. D.; Ealick, S. E.; Bugg, S. E.; Parks, R. E. Jr. Design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Fed. Proc.* **1986**, 45, 2773-2778; (b) Montgomery, J. A. Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1994**, 3, 1303-1313; (c) Chan, T. S. Deoxyguanosine toxicity on lymphoid cells as a cause for immunosuppression in purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Cell* **1978**, 14, 523-530; (d) Cohen, A.; Gudas, L. J.; Ammann, A. J.; Staal, G. E.; Martin, D. W. Jr. Deoxyguanosine triphosphate as a possible toxic metabolite in the immunodeficiency associated with purine nucleoside phosphorylase deficiency. *J. Clin. Invest.* **1978**, 61, 1405-1409.
9. Halazy, S.; Ehrhard, A.; Danzin, C. (9-(Difluorophosphonoalkyl)guanines as a new class of multisubstrate analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc*. **1991**, 113, 315-317.
10. Levy, S. G.; Wasson, D. B.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. Synthesis of 2-chloro-2′,5′-dideoxy-5′-(phosphinyldifluoromethyl)adenosine: A nonhydrolyzable isosteric, isopolar analog of 2-chlorodeoxyadenosine monophosphate. *Synthesis* **1996**, 7, 843-846.
11. Matulic-Adamic, J.; Haeberli, P.; Usman, N. Synthesis of nucleoside 5′-deoxy-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5′-difluoromethylphosphonate nucleotide analogs. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2563-2569.

12. Vina, D.; Wu, T.; Renders, M.; Laflamme, G.; Herdewijn, P. Synthesis of 3′-*O*-phosphonomethyl nucleosides with an adenine base moiety. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2634-2646.
13. (a) Kempeneers, V.; Vastmans, K.; Rozenski, J.; Herdewijn, P. Recognition of threosyl nucleotides by DNA and RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 6221-6226; (b) Chaput, J. C.; Szostak, J. W. TNA synthesis by DNA polymerases. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9274-9275.
14. Scott, W. G.; Horan, L. H.; Martick, M. The hammerhead ribozyme: structure, catalysis, and gene regulation. *Prog. Mol. Biol. Trans l Sci.* **2013**, 120, 1-23.
15. Kempeneers, V.; Froeyen, M.; Vastmans, K.; Herdewijn, P. Influence of threose nucleoside units on the catalytic activity of a hammerhead ribozyme. *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 112-123.
16. Wu, T.; Froeyen, M.; Kempeneers, V.; Pannecouque, C.; Wang, J.; Busson, R.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. Deoxythreosyl phosphonate nucleosides as selective anti-HIV agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5056-5065.
17. Ahn, S. K.; Kim, D.; Son, H. J.; Jeong, B. S.; Hong, R. K.; Kim, B. Y.; Kim, E. N.; Chung, K. H.; Kim, J. W. Synthesis of (±)-2′,3′-dideoxy-3′-fluoroapiosylpyrimidine nucleosides. *Chem. Commun.* **1998**, 967-978.
18. (a) Jackson, G.; Jones, H. F.; Petursson, S.; Webber, J. M. Diphenylmethylation of carbohydrate hydroxy groups by the reaction with diazo(diphenyl)methane. *Carbohydr. Res.* **1982**, 102, 147-157; (b) Best, D.; Jenkinson, S. F.; Rule, S. D.; Higham, R.; Mercer, T. B.; Newell, R. J.; Weymouth-Wilson, A. V.; Fleet, G. W.; Petursson, S. High yield of alcohol, inclusing tertiary and base sensitive alcohols, as benzhydryl ethers by heating with diphenyldiazomethane in the absence of any other reagent. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 2196-2199.
19. (a) Ko, K.-Y.; Kim, J.-Y. Generation of diphenylmethane by oxidation of benzophenone hydrazone with magtrieve. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1999**, 20, 771-772; (b) Miller, J. B. Preparation of crystalline diphenyldiazomethane. *J.*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Org. Chem. **1959**, 24, 560-561.

20. (a) Taylor, S. D.; Kotoris, C. C.; Hum, G. Recent advances in electrophilic fluorination. *Tetrahedron* **1999**, 55, 12431-12477; (b) Ma, J.-A.; Cahard, D. Asymmetric fluorination, trifluorination, and perfluoroalkylation reactions. *Chem. Rev*. **2004**, 104, 6119-6146; (c) Gilicinski, A. G.; Pez, G. P.; Syvret, R. G.; Sankar Lal, G. On the relative power of electrophilic fluorinating reagent of the N-F class. *J. Fluorine Chem.* **1992**, 59, 157-162.
21. McAtee, J. J.; Schinazi R. F.; Liotta, D. C. A completely diastereoselective electrophilic fluorination of a chiral, noncarbohydrate sugar ring precursor: Application to the synthesis of several novel 2′-fluoronucleosides. *J. Org. chem*. **1998**, 63, 2161-2167.
22. Rassu, G.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Caetani, E.; Casirsghi, G. Expeditious synthesis of sugar-modified nucleosides and collections thereof exploiting furan-, pyrrole-, and thiophen-based dienes. *J. Med. Chem*. **1997**, 40, 168-180.
23. Berkowitz, D. B.; Eggen, M.; Shen, Q.; Sloss, D. G. Synthesis of (α,α,-difluoroalkyl) phosphonates by displacement of primary triflates. *J. Org. chem*. **1993**, 58, 6174-6176.
24. Walczak, K.; Lau, J.; Pedesen, E. B. 2,3,6-Trideoxy-5-*O*-(4-nitrobenzoyl)-3-trifluoroacetamido-L-*ribo*-hexofuranosyl bromide - A suitable furanoid ristosamine glycosylation reagent. *Synthesis* **1993**, 790-792.
25. (a) Olah, G. A.; Prakash, K. S.; Narang, S. C. Convenient reductive cleavage of benzylic (benzhydrilic) ethers and acetals using $AlCl_3$/Pd-catalyzed hydrogen transfer from cyclohexene. *Synthesis* **1978**, 825-828; (b) Baxter, E. W.; Reitz, A. B. Expeditious synthesis of aza sugars by the double reductive amination of dicarbonyl sugars. *J. Org. Chem*. **1994**, 59, 3175-3185; (c) Hirst, G. C. Johnson, T. O.; Overman, L. E. First total synthesis of lycopodium alkaloids of the maggellanane group. Enantioselective total syntheses of (–)-magellanine and (+)-magellaninone. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, 115, 2992-2993.
26. Vorbrüggen, H. Nucleoside analogs, *Chemistry, Biology and Medical Applications*; NATO ASI Series A 26; Plenum Press: New Tork, **1980**; p 35.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

27. Hocková, D.; Holý, A.; Masojídková, M.; Keough, D. T.; De Jersey, J.; Guddat, L. W. Synthesis of branched 9-[2-(2-phosphonoethoxy)ethyl]purines as a new class of acyclic nucleoside phosphonates which inhibit Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Bioorg. Med. Chem*. **2009**, 17, 6218-6232.
28. Robins M. J.; Uznanski, B. Non-aqueous diazotization with *t*-butyl nitrite. Introduction of fluorine, chlorine, and bromine at *C*-2 of purine nucleoside. *Can. J. Chem*. **1981**, 59, 2608-2611.
29. Montgomery, J.; Hewson, K. Nucleosides of 2-fluoroadenine. *J. Med. Chem*. **1969**, 12, 498-504.
30. Tong, G. L.; Ryan, K. J.; Lee, W. W.; Acton, E. M. Goodman, L. Nucleosides of thioguanine and other 2-amino-6-substituted purines from 2-acetamido-5-chloropurine. *J. Org. Chem*. **1967**, 32, 859-862.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

국문 초록

항바이러스제로서 불소 함유 에피오실 뉴클레오사이드 포스폰산의 합성

김 세 연
지도 교수 : 홍 준 희
약 학 과
조선대학교 대학원

하나 이상의 불소 원자를 가진 신약 후보물질들이 일반화되고 있다. 2' 위치에 불소 원자를 치환된 항바이러스 뉴클레오사이드는 글리코실 결합의 안정성을 증가시킨다. 그것은 에피오실 뉴클레오사이드 포스포네이트 유도체들의 2' 과 5' 위치에 세 개의 불소 원자들을 치환하는 것에 대한 영향에 대해 많은 흥미를 가지게 하였다. 다양한 피리미딘과 퓨린 2′,5′,5′-trifluoro-3′-hydroxy-apiose 뉴클레오사이드 포스폰산 유도체들은 1,3-dihydroxyacetone로부터 얻어진 화합물을 통해서 합성되었다. 락톤의 친전자성 플루오르화는 NFSI를 이용하여 수행되었고 축합은 뉴클레오사이드 포스포네이트 유도체의 수득을 위해 글리코실의 공여체로부터 성공적으로 진행되었다. 디에틸 포스포네이트는 Deprotection을 통해 최종적으로 포스폰산 나트륨 염을 제공한다. 합성된 뉴클레오사이드 유도체들은 다양한 바이러스들에 대한 항바이러스 활성과 약효 검색을 수행하였다.

Collection @ chosun