



УДК 547.963.32.057

ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

XIV *. СИНТЕЗ ФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ P^1, P^4 -БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТЕТРАФОСФАТА И 5'-НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ

Гарусова Н. Б., Завгородний С. Г., Осипова Т. И.

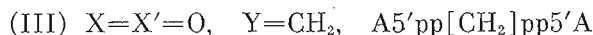
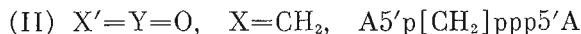
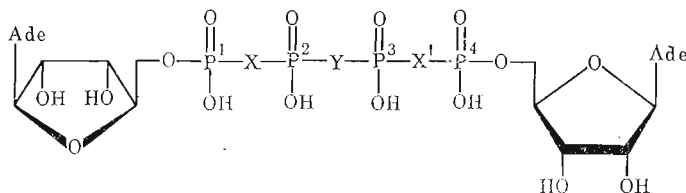
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Экспериментально проверены различные подходы к синтезу фосфонатных аналогов P^1, P^4 -бис (5'-аденозил) тетрафосфата ($A5'p_45'A$) и 5'-нуклеозидтрифосфатов. Получены новые вещества — $A5'pp[CHBr]pp5'A$ (I), $A5'p[CH_2]ppp5'A$ (II) и $pp[CH_2]p5'C$. Аналог (I) расщепляется фосфодиэстеразой змеиного яда до АМР, аналог (II) — только до $pp[CH_2]p5'A$ и АМР. Разработаны удобные методы получения защищенных нуклеозидов, исходных в синтезах 5'-нуклеозидполифосфатов.

Ряд исследований последних лет [2–5] свидетельствует о том, что P^1, P^4 -бис (5'-аденозил) тетрафосфат ($A5'p_45'A$) может быть метаболическим сигналом в регуляции клеточных процессов. Для регулирования ферментов, катализирующих синтез и гидролиз $A5'p_45'A$, а также для исследования функций этого нуклеотида в клетке перспективно применение различных аналогов $A5'p_45'A$, в том числе соединений, устойчивых к ферментативному гидролизу.

Недавно нами были синтезированы первые фосфонатные аналоги $A5'p_45'A$ [6] и показано, что аналог $A5'pp[CH_2]pp5'A$ (III) по физико-химическим характеристикам близок к $A5'p_45'A$. Для этого соединения, а также для аналогов, описанных в работе [6], исследовано взаимодействие с ферментами, катализирующими аминоацилирование тРНК. Они достаточно хорошо имитировали свойства $A5'p_45'A$, связывались с аминоацил-тРНК — синтетазы и ингибировали синтез $A5'p_45'A$ [7]. В качестве модельного гидролизующего фермента, при помощи которого можно было оценить стабильность аналогов $A5'p_45'A$ к ферментативному гидролизу, использована фосфодиэстераза змеиного яда, вызывающая полный гидролиз фосфорной цепи $A5'p_45'A$ [2, 6].

В этой работе описано получение новых веществ: симметричного бромметилевого аналога динуклеозидтетрафосфата, $A5'pp[CHBr]pp5'A$ (I) и несимметричного метилевого аналога $A5'p[CH_2]ppp5'A$ (II).



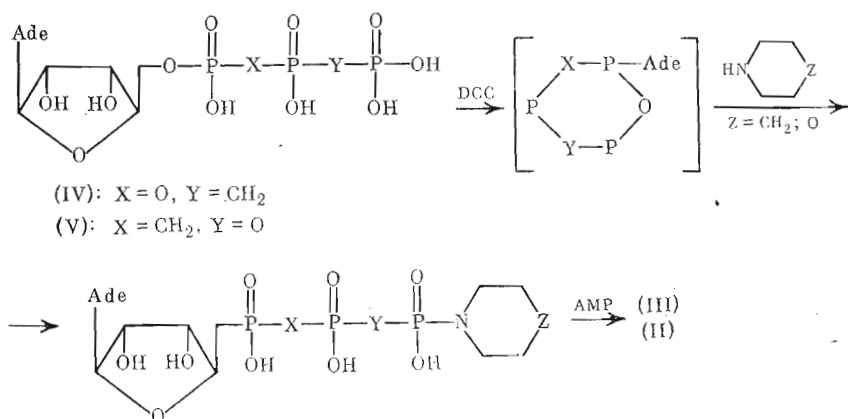
* Сообщение XIII см. [1]. Принятые сокращения: $A5'pp[CHBr]pp5'A$, $A5'p[CH_2]ppp5'A$, $pp[CH_2]p5'A(C)$ — фосфонатные аналоги нуклеозидполифосфатов (показана группа, заменяющая ангидридный кислород), DCC — N,N'-дипилогексилкарбодимид, CDI — N,N'-карбонилдимидазол.

Целесообразность поиска биологически активных аналогов полифосфатов нуклеозидов, содержащих галоидфосфонатные группировки, обоснована в работе [8] и подтверждается работами по синтезу ингибиторов ферментов, аналогов АТР [9].

Бромметиленовый аналог (I), как и аналог (III) [6], был синтезирован путем активации соответствующего дифосфоната с помощью СДИ и далее взаимодействием полученного дифосфонатдиимидазолида с избытком АМР. Выход соединения (I) был значительно выше, чем в случае аналога (III), что, по-видимому, является следствием увеличения реакционной способности фосфоновых групп под действием электроноакцепторного заместителя. Соединения (I) и (III) полностью расщеплялись фосфодиэстеразой за 2 ч до АМР. По величине гипохромного эффекта (18%) соединение (I) близко производному (III) (19%) и А5'p₄5'А.

Получение аналогов динуклеозидтетрафосфата несимметричной структуры, например соединения (II) или аналогов с различными остатками нуклеозидов, представляло более сложную задачу. Возможно несколько вариантов синтеза таких структур. Как наиболее общий, мы разрабатывали метод амидной активации γ-фосфорильной или фосфонильной группы аналогов 5'-нуклеозидтрифосфатов для синтеза фосфоангидридной связи, опираясь на некоторые аналогии [10]. В качестве модельного был выполнен синтез известного соединения (III). Для этого р[СН₂]pp5'А (IV) обрабатывали DCC (см. схему 1), предполагаемый промежуточный продукт типа циклического триметафосфата при взаимодействии с аминами (пиперидин, морфолин) превращался в γ-фосфамид аналога АТР, который далее реагировал с АМР. Последний мог быть заменен другими нуклеотидами или их производными. Выходы невысоки (20–25%), но синтез при этом протекал достаточно направленно, и выделение продукта при помощи ионообменной хроматографии не представляло затруднений. Таким же образом было получено соединение (II) из pp[СН₂]p5'А (V) и АМР.

Схема 1



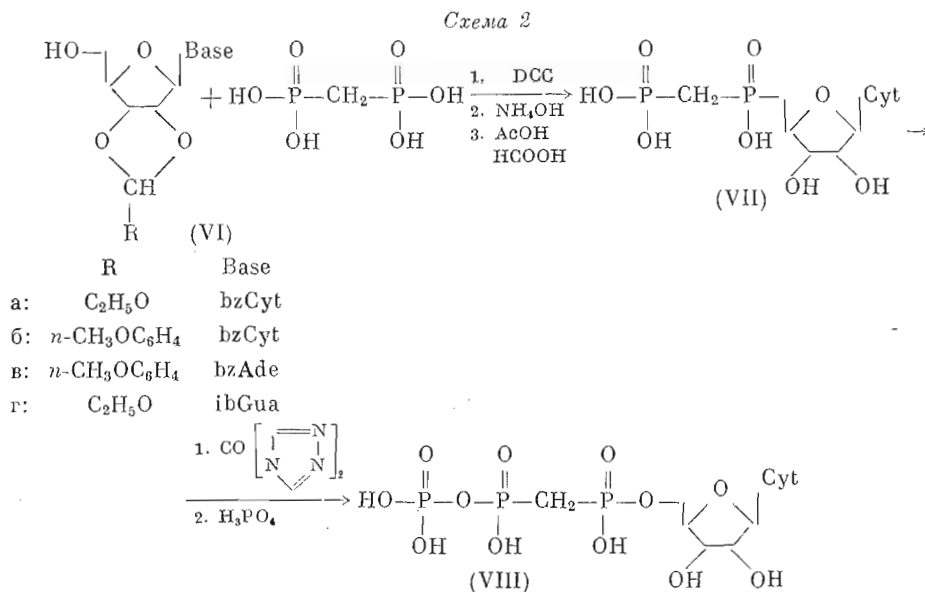
Структура аналога (II) была подтверждена данными ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектров. Гипохромный эффект для этого соединения, определенный по данным УФ-спектров, составлял 15%. А5'p[СН₂]ppp5'А (II) отличался большей стабильностью при гидролизе фосфодиэстеразой, чем аналоги (I) и (III): полный ферментативный гидролиз этого вещества проходил более медленно (за 4 ч) с расщеплением только в одном положении так, что продуктами гидролиза являлись АМР и pp[СН₂]p5'А (V).

В описанных синтезах аналогов А5'p₄5'А использовались известные фосфонатные аналоги АТР — (IV) и (V) [11]. Эти соединения были получены имидазолидным методом, который оказался более удобным, чем описанный в литературе способ с использованием DCC. В синтезе производного (IV) активировали АМР, в случае аналога (V) — 5'-метилендифос-

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	¹ H-ЯМР-спектры в DMSO-d ₆					
			δ, м.д.					
			H-8 (H-6)	H-2 (H-5)	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'
(VIa)	91	152–153	8,22	7,28	5,95	4,85	4,78	4,31
(VIб)	94	200–202	8,37	7,39	6,04	5,06	4,90	4,43
(VIв)	95	176–177	8,82	8,76	6,47	5,60	5,12	4,47
(VIr)	84	–	8,18; 8,16 *	–	6,13; 5,99 *	5,31; 5,30 *	5,13 *; 4,94	4 23; 4,14

фонат аденозина, который был получен по модифицированной методике Майерса [12].

Однако имидазольный метод не является универсальным для получения фосфонатных аналогов нуклеозидтрифосфатов. Это было отмечено при синтезе аналога цитидин-5'-трифосфата, pp[CH₂]_p5'C (VIII), из 5'-метилендифосфоната цитидина (VII) и ортофосфата (схема 2). Только использование карбонилдитриазола дало возможность провести синтез такого аналога. Соединение (VII) получали из 2',3'-ортоэфира N-защитного цитидина (VIa, б) конденсацией с метилендифосфоновой кислотой в присутствии DCC (см. схему 2). Удаление N-защитной группы проводили водным аммиаком, ортоэфирной – водной уксусной кислотой, пирофосфатные связи продуктов поликонденсации разрушали разбавленной муравьиной кислотой.



Ортоэфир (VI) был получен нами по модифицированному методу [13] с использованием триметилсилильной защитной группы для 5'-гидроксильной функции. Этот метод позволяет получить также с высокими выходами 2',3'-ортоэфирные производные аденозина (VIв) и гуанозина (VIr) (см. таблицу).

Полученные результаты дают возможность выбора условий синтеза и реагентов для осуществления различных вариантов синтеза структурных аналогов A5'p,5'A и 5'-нуклеозидполифосфатов.

¹H-ЯМР-спектры в DMSO-d₆

δ, м.д.		J, Гц			
Н-5', а, б	прочие	1', 2'	2', 3'	3', 4'	прочие
3,4-3,7	7,4-8,0(Ph), 6,04(CH), 3,4-3,7(CH ₂), 1,18(CH ₃)	2	6,5	3	7,5(Н-5, Н-6), 7(этил)
3,55-3,75	8,2-7,3(Ph), 7,27(C ₆ H ₄), 5,96(CH), 3,83(CH ₃)	2	6,5	3	7,5(Н-5, Н-6), 8,5(C ₆ H ₄)
3,5-3,7	7,5-8,2(Ph), 7,32(C ₆ H ₄), 6,04(CH), 3,84(CH ₃)	2,5	6,5	3	8,5(C ₆ H ₄)
3,4-3,7	6,15 * и 6,10(2CH), 3,4-3,7(CH ₂), ~2,8(2CH), 1,0-1,3(6CH ₃)	3; 2,5 *	6,5; 6 *		6(изопропил), 6(этил)

* Поскольку нуклеозид (X) представляет собой смесь двух диастереомеров в соотношении ~3:2, отмечены параметры преобладающего диастереомера (за исключением сильно перекрывающихся сложных мультиплетов).

Разработка синтетических путей позволила получить различные типы фосфонатных аналогов А5'p₅'А для исследования ферментов, участвующих в биосинтезе и превращениях этого нуклеотида.

Экспериментальная часть

В работе были использованы АМР, АТР, СТР (Reanal, ВНР), фосфодиэстераза змеиного яда (Worthington, США), Chellex-100 (Bio-Rad, США), DEAE-целлюлоза DE-32 (Whatman, Англия), пластинки для ТСХ Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) и пластинки с РЕИ-целлюлозой (Merck, ФРГ).

Системы для ТСХ: изопропанол — аммиак (25%) — вода, 7:1:2 (А); диоксан — аммиак (25%) — вода, 6:1:4 (Б); 1 М LiCl (В); хлороформ — ацетон, 9:1 (Г); метанол — 10% СCl₃COOH — аммиак (25%) — вода, 10:1:3:6 (Д).

УФ-спектры сняты на спектрофотометрах Specord UV VIS (ГДР), Ultrospec 4050 (ЛКВ, Швеция), спектры ЯМР — на приборе Varian XL-100-15 (США). ³¹P-ЯМР-спектры снимали при шумовом подавлении сигналов протонов. Образцы для спектров очищали при помощи Chellex-100 и 8-оксихинолина в хлороформе. Все химические сдвиги (δ) в ¹H-ЯМР-спектрах даны в м.д. относительно *трет*-бутанола, а в ³¹P-ЯМР-спектрах — относительно триметилфосфата как внутреннего стандарта.

Гидролиз нуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда проводили в соответствии с методикой [3].

А5'pp[CHBr]pp5'А (I). К раствору 1 ммоль Вu₃NH⁺-соли бромметиллендифосфоновой кислоты [14] в 15 мл абс. DMF добавляли 10 ммоль CDI, перемешивали 12 ч при 4°С, добавляли 0,2 мл MeOH, перемешивали, через 30 мин к раствору добавляли 6 ммоль Вu₃NH⁺-соли АМР в 10 мл абс. DMF, перемешивали 12 ч при 4°С, разбавляли водой до 500 мл, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой DE-32 (НСO₃⁻-форма, 300×40 мм). Разделение проводили в градиенте концентраций NH₄НСO₃ (0,1→0,6 М, 4 л). Фракции, содержащие производное (I), которое элюировалось при концентрации буфера 0,40–0,42 М, упаривали досуха, затем 2–3 раза с водой и этанолом для удаления NH₄НСO₃, остаток лиофилизировали. Состав фракций анализировали с помощью ТСХ на силикагеле (системы А, Б) и РЕИ-целлюлозе (В). Выход соединения (I) 74%, R_f 0,12 (А), 0,80 (Б) и 0,11 (В). Для А5'p₅'А R_f 0,10 (А), 0,80 (Б) и 0,10 (В). УФ-спектр: λ_{макс} 259 нм (ε 24600). ¹H-ЯМР: 6,01 (д, Н1', J 5 Гц); 8,11 (с, Н2); 8,41 (с, Н3). ³¹P-ЯМР: -1,08 (д, P¹); -13,73 (д, P², J_{P¹P²} 24,9 Гц).

Фосфоатные аналоги АТР (IV) и (V) получены по методике синтеза аналога (VIII), но с CDI. Выход соединений (IV) — 52%, (V) — 46%. Эти соединения, по данным ТСХ в системах А — В, идентичны веществам с известной структурой.

А5'p[CH₂]ppp5'А (II) и А5'pp[CH₂]pp5'А (III). К растворам Вu₃NH⁺-солей соединений (V) или (IV) (получены из 0,17 ммоль NH₄⁺-солей

этих аналогов) в 1,5 мл абс. DMSO добавляли 0,6 ммоль DCC, перемешивали 1 ч при 20° С, добавляли 1,7 ммоль амина (пиперидина или морфолина), перемешивали 1 ч при 20° С, затем к смеси прилевали 20 мл абс. эфира, эфир декантировали, осадок растворяли в 2 мл абс. DMSO, фильтровали. К фильтрату добавляли 0,10 ммоль Bu_3NH^+ -соли AMP, перемешивали 4 сут при 40° С. Выделение производных (II) и (III) на целлюлозе DE-32 проводили в соответствии с вышеприведенной методикой выделения аналогов А5'p,5'А. Выходы соединений (II) и (III) составляли 22 и 20%. Для аналога (II) R_f 0,13 (А), 0,80 (Б), 0,12 (В). УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}$ 259 нм (ϵ 25 400). ^1H -ЯМР: 8,44 (с, Н8); 8,12 (с, Н2); 6,02 (д, Н1', J 5 Гц); 2,48 (т, CH_2 , J 20 Гц), ^{31}P -ЯМР: 14,06 (д, P^1 , $J_{\text{P}^1\text{P}^2}$ 7,2 Гц); 4,94 (к, P^2 , $J_{\text{P}^2\text{P}^3}$ 23,7 Гц); -25,5 (к, P^3 , $J_{\text{P}^3\text{P}^4}$ 18,5 Гц); -14,00 (д, P^4).

Данные для аналога (III) приведены в работе [6].

Синтез N-защитенных 2',3'-ортоэфирных или ацетальных производных нуклеозидов (VIa — г). Общая методика. К 2 ммоль 2',3'-ортоэфирных или ацетальных производных нуклеозидов в 10 мл абс. пиридина (в случае производных гуанозина — в 20 мл) добавляли 2,53 мл (20 ммоль) триметилхлорсилана (в случае производных гуанозина — 2-кратное количество). Через 15 мин смесь обрабатывали 0,92 мл (8 ммоль) бензоилхлорида (в случае производных гуанозина — 3,30 мл (20 ммоль) изомасляного ангидрида), перемешивали 2 ч при 20° С (для производных гуанозина — 3 ч), после чего охлаждали льдом и обрабатывали 2 мл воды (для производных гуанозина — 4 мл). Дальнейшую обработку конц. аммиаком проводили как указано в работе [13] (2 мл для цитидиновых и 4 мл для гуанозино-вых производных). Смесь упаривали, остаток распределяли между водой и хлороформом, органический слой отделяли, а водный экстрагировали хлороформом. Объединенные экстракты промывали водой, сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Соединения (VIa) и (VIб) выделяли перекристаллизацией, а производное (VIг), представляющее собой смесь двух диастереомеров, — хроматографией на колонке (4×9,5 см) с силикагелем L 40/100, элюируя продукт 5% этанолом в хлороформе. Выходы и физико-химические характеристики см. в таблице.

5'-Метилендифосфонат цитидина (VII). К раствору 1,62 г (9,25 ммоль) метилендифосфоновой кислоты в водном пиридине прибавляли 4,4 мл Bu_3N (18,50 ммоль), упаривали, высушивали упариванием с пиридином, добавляли 1 ммоль (VIa) или (VIб) и 7,40 г DCC, перемешивали 4 сут при 4° С, отделяли осадок, фильтрат разбавляли вдвое водой, экстрагировали эфиром. Водный слой упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 25% NH_4OH (50 мл), выдерживали 3 сут при 20° С, упаривали, растворяли в 20 мл 80% CH_3COOH , нагревали 1 ч при 50° С, упаривали, остаток растворяли в 20% HCOOH , выдерживали 20 ч при 4° С, упаривали в вакууме. Очистку продукта проводили на колонке с даэксом 50W×8 (H^+ -форма, 3×15 см, 200—400 меш), элюируя продукт водой. Выход соединения (VI) 200 мг (45%). УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}$ (рН 11) 274 нм (ϵ 7300), $\lambda_{\text{макс}}$ (рН 1) 281 нм (ϵ 13 300). R_f 0,12 (А), 0,7 (Б), 0,6 (В). ^1H -ЯМР: 2,26 (т, CH_2 , J 20 Гц); 5,88 (д, Н1', J 4 Гц); 6,50 (д, Н5, J 7,5 Гц); 8,00 (д, Н6, J 7,5 Гц).

pp[CH₂]p5'С (VIII). К раствору 120 мг (0,27 ммоль) Bu_3NH^+ -соли производного (VII) в 5 мл DMF добавляли 200 мг карбонилдитриазола [15], перемешивали 3 ч при 4° С, добавляли 0,1 мл MeOH, через 30 мин прибавляли 2,4 ммоль Bu_3NH^+ -соли H_3PO_4 , перемешивали 12 ч при 4° С, упаривали при 5 мм рт. ст., растворяли в 250 мл воды, наносили на колонку (200×40 мм) с целлюлозой DE-32 (HCO_3^- -форма) и хроматографировали в градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0,2→0,5 М, 3 л). Вещество (VII) элюировалось при концентрации $\text{NH}_4\text{HCO}_3 \sim 0,35$ М. При концентрации 0,41—0,42 М выходил пик, соответствующий димеру соединения (VIII). Элюэнты обрабатывали по вышеприведенным методикам. Выход аналога (VIII) 20 мг (14%), выход димера — 20%. УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}$ (рН 11) 274 нм (ϵ 7300), $\lambda_{\text{макс}}$ (рН 1) 281 нм (ϵ 13 200). R_f 0,25 (Б) и 0,17 (В). Для СТР R_f 0,20 (Б) и 0,14 (В). ^1H -ЯМР: 2,30 (т, CH_2 , J 20 Гц); 5,9 (д, Н1', J 4 Гц); 6,6 (д, Н5, J 7,5 Гц); 8,00 (д, Н6, J 7,5 Гц).

Авторы приносят благодарность Р. М. Хомутову за ценные замечания при обсуждении статьи, а также С. В. Мешкову и М. Ю. Покровской за помощь в спектральных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Хомутов Р. М. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 2, с. 213-219.
2. Rapoport E., Zamecnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 76, № 11, p. 3984-3988.
3. Randerath K., Janeway C. M., Stephensen M. L., Zamecnik P. C. Biochim. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 24, № 1, p. 98-105.
4. Plateau P., Mayaux J. F., Blanquet S. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4654-4662.
5. Floodgaard H. F., Klenov H. Biochem. J., 1982, v. 208, № 2, p. 737-742.
6. Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 838-843.
7. Tarusova N. B., Osipova T. I., Biriukov A. I., Pokrovskaya M. I., Meshkov S. V., Gnuchev N. V. Nucleic Acids Res. Symp. Series, 1984, № 14, p. 287-288.
8. Blackburn N. Chem. Ind., 1981, № 3, p. 134-138.
9. Бирюков А. И., Тарусова Н. Б., Амонтов С. Г., Осипова Т. И., Горяченкова Е. В., Рабишков А. Г. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 598-604.
10. Kappler F., Hai T. T., Abo M., Hampton A. J. Med. Chem., 1982, v. 25, № 11, p. 1179-1184.
11. Yount R. G. Advances in Enzymology, 1975, v. 43, p. 1-50.
12. Myers T. C., Nakamura K., Danielzadeh A. J. Organ. Chem., 1968, v. 30, № 3, p. 1517-1520.
13. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1316-1319.
14. Quimby O. T., Prentice J. B., Nicholson D. J. Organ. Chem., 1967, v. 32, № 8, p. 4111-4114.
15. Birkofer L., Richter P., Ritter A. Chem. Ber., 1960, v. 93, № 8, p. 2804-2809.

Поступила в редакцию
19.XII.1984

ORGANOPHOSPHOROUS ANALOGUES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS. XIV. THE SYNTHESIS OF P¹, P²-BIS (5'-ADENOSYL)TETRAPHOSPHATE AND 5'-NUCLEOSIDETRIPHOSPHATE PHOSPHONATE ANALOGUES

TARUSOVA N. B., ZAVGORODNY C. G., OSIPOVA T. I.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Various approaches to the synthesis of P¹,P²-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (A5'p₂5'A) and 5'-nucleosidetriphosphate phosphonate analogues by means of phosphoamide activation are described. The following new analogues have been synthesized: A5'pp[CHBr]pp5'A, A5'p[CH₂]ppp5'A, and pp[CH₂]p5'C. Snake venom phosphodiesterase split the first of these substances to AMP, whereas the hydrolysis of the second analogue led to AMP and pp[CH₂]p5'A. Convenient ways to N,O-substituted nucleosides, initial substances in the above syntheses, are developed.