



УДК 547.78/79'492+547.854.4'455.623'118+547.854.4'455.522'118+547.781.2

**ПРИМЕНЕНИЕ N,N'-КАРБОНИЛБИСАЗОЛОВ ДЛЯ СИНТЕЗА
НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТСАХАРОВ И ВЛИЯНИЕ
N-МЕТИЛИМИДАЗОЛА НА ЭТОТ ПРОЦЕСС *****Белоусова З. П., Шурыгин П. П., Данилов Л. Л.*,
Шибяев В. Н. ****Куйбышевский государственный университет;*** Институт органической химии им. П. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

Исследована реакционная способность N,N'-карбонилбисимидазола, N,N'-карбонилбисбензимидазола, N,N'-карбонилбистриазола и N,N'-карбонилбисбензотриазола при получении нуклеозидфосфазолидов реакцией с уридин-5'-фосфатом, цитидин-5'-фосфатом и гуанозин-5'-фосфатом. Показано, что скорость реакции возрастает с увеличением положительного заряда на карбонильном атоме углерода молекулы карбонилбисазола и максимальна для производных триазола. Скорость активации нуклеозидфосфатов N,N'-карбонилбисбензотриазолом и N,N'-карбонилбисбензимидазолом существенно ниже, но может быть увеличена прибавлением к реакционной смеси избытка N-метилимидазола. Реакцией нуклеозидфосфазолидов с глюкозо-1-фосфатом с высоким выходом получены уридиндифосфат-, цитидиндифосфат- и гуанозиндифосфатглюкоза. Показано, что скорость пирофосфатного синтеза зависит от природы остатков азота в активированном нуклеозидфосфате и в случае производных триазола, бензотриазола и бензимидазола увеличивается при прибавлении N-метилимидазола.

Нуклеозиддифосфатсахара являются субстратами многих ферментативных систем, ответственных за метаболизм углеводов [2]. Для создания пирофосфатной связи в этих соединениях одним из хорошо зарекомендовавших себя методов является синтез с использованием нуклеозид-5'-фосфоимидазолидов (легко получаемых взаимодействием нуклеозид-5'-фосфатов с N,N'-карбонилбисимидазолом) в качестве активированного компонента [3]. Ранее сообщалось об успешном применении аденозин-5'-фосфобензотриазолида для синтеза аденозин-5'-дифосфата [4].

Настоящая работа посвящена исследованию получения нуклеозид-5'-фосфазолидов — производных бензимидазола, 1,2,4-триазола и бензотриазола — взаимодействием нуклеотидов с соответствующими N,N'-карбонилбисазолами и изучению возможности использования этих соединений в качестве активированных производных при синтезе нуклеозиддифосфатсахаров.

Первоначально мы исследовали взаимодействие уридин-5'-фосфата (Ia) с N,N'-карбонилбисазолами (IIa—г) (схема 1). Реакцию проводили в среде абс. DMF/0,1 M раствор бистриэтиламониевой соли нуклеотида с 4 экв. карбонилбисазола при 0° С. Смесь анализировали с помощью ТСХ и выдерживали до полного исчезновения нуклеозид-5'-фосфата. Необходимое для этого время, а также выход и хроматографические свойства образующихся нуклеозид-5'-фосфазолидов приведены в табл. 1. Реакция уридинфосфата (Ia) с карбонилбисбензотриазолом (IIг) и карбонилбисбензимидазолом (IIб) приводит к целевому азолиду с более низким выходом, так как в этом случае образующийся уридин-5'-фосфазолид в заметной степени успевает взаимодействовать с еще неактивированными молекулами уридин-5'-фосфата с образованием симметричного P¹, P²-бисуридин-5'-пирофосфата (идентификация по ТСХ и электрофорезу).

Аналогичная картина наблюдается при активации метилтриэтиламониевой соли цитидин-5'-фосфата (триэтиламониевая соль не раство-

* Предварительное сообщение см. [1].

Активация нуклеозид-5'-фосфатов N,N'-карбонилбисазолами

Нуклеозид-5'-фосфат	Активирующий реагент	Время реакции, ч	Выход азолида, % (номер)	R_f (система А)	E_{NMP}^*
Ia	IIa	2,5	98 (III)	0,50	0,72
	IIб	14,0	70 (IV)	0,46	0,65
	IIв	1,5	98 (V)	0,50	0,72
Iб	IIг	5,0	75 (VI)	0,45	0,69
	IIa	9,0	96 (VII)	0,46	0,62
	IIб	40,0	75 (VIII)	0,45	0,55
	IIв	5,0	95 (IX)	0,46	0,62
Iв	IIг	18,0	70 (X)	0,43	0,59
	IIa	3,0	90 (XI)	0,50	0,72
	IIб	23,0	65 (XII)	0,48	0,65
	IIв	2,0	85 (XIII)	0,50	0,72
	IIг	8,0	65 (XIV)	0,44	0,68

* Электрофоретическая подвижность на бумаге FN-11 относительно соответствующего NMP (Ia—в) в 0,05 М ТЕАВ, рН 7,5.

Таблица 2

УФ-спектры нуклеозид-5'-фосфазолидов (вода, рН 7,0)

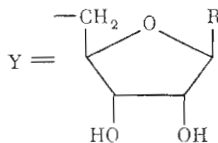
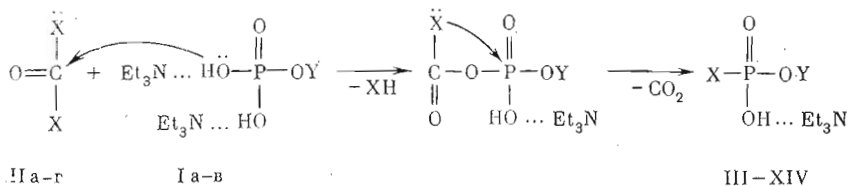
Азолид	λ_{max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ_{min} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	A_{252}/A_{260}	A_{250}/A_{260}	A_{290}/A_{260}
III	262	10,0	—	—	1,23	0,96	0,38
IV	248	16,9	257 277	15,3 9,6			
V	262	15,6	—	—	0,81	0,60	0,27
	271 *	14,5					
	279	10,4					
	262	10,0					
VI	262	16,2	233	8,3	1,23	0,96	0,38
VII	271	9,1	—	—			
VIII	239	19,3	259	12,8	1,25	0,7	0,32
	272	15,6	276	13,2			
	279	14,2					
IX	271	9,1	—	—	0,90	1,02	0,49
	X	271	14,3				
XI	252	13,7	—	—	1,25	0,7	0,32
	XII	250	19,8	259			
XIII	271	13,5	276	11,4	1,21	0,72	0,23
	279	11,8					
	XIV	252	13,7	—			
XIV	252	19,6					

* Точка перегиба.

натов полосы при 1805 см^{-1} , а также положительная реакция на цикликоли [6]. При мягком кислотном гидролизе нуклеозидфосфазолидов (III)–(XIV) (0,1 н. HCl, 100°C , 15 мин) регенерировались исходные нуклеозид-5'-фосфаты (Ia—в) (идентификация по ТСХ и электрофорезу).

Реакционная способность N,N'-карбонилбисазолов при образовании нуклеозид-5'-фосфазолидов хорошо коррелирует с кинетикой их гидролиза и метанолиза [7]. Как показывают расчеты распределения электронной плотности в молекулах N,N'-карбонилбисазолов [8], уменьшение реакционной способности в ряду (IIв)–(IIa)–(IIг)–(IIб) коррелирует с уменьшением положительного заряда на атоме углерода С=О-группы. Таким образом, можно предположить, что скорость реакции образования нуклеозидфосфазолидов из N,N'-карбонилбисазолов определяется в основном скоростью нуклеофильной атаки отрицательно заряженного атома кислорода фосфатной группы нуклеозидфосфата по карбонильному атому углерода (схема 2), которая при прочих равных условиях должна зависеть от величины эффективного положительного заряда при этом атоме.

Схема 2



Карбонилбисбензимидазол (IIб) и карбонилбисбензотриазол (IIг) более устойчивы и удобны в синтетической работе, хотя и менее реакционноспособны, чем карбонилбисимидазол (IIа) и карбонилбистриазол (IIв). Мы обнаружили, что при добавлении к реакционной смеси избытка N-метилимидазола реакция с этими соединениями существенно ускоряется и образование симметричного пирофосфата подавляется (см. табл. 3).

Таблица 3

Активация уридин-5'-фосфата (Ia) в присутствии N-метилимидазола

Активирующий реагент	Количество MeIm, моль/моль (Ia)					
	0		6		12	
	время реак-ции, ч	выход азо-лида, %	время реак-ции, ч	выход азо-лида, %	время реак-ции, ч	выход азо-лида, %
IIб	14	70	9	96	6	98
IIг	5	75	1.5	98	0,75	98

Нуклеозидфосфазолиды (VI) и (IV), полученные в присутствии N-метилимидазола, по данным УФ-спектров, хроматографической и электрофоретической подвижности, были идентичны соединениям, полученным в его отсутствие.

Реакцию пирофосфатного синтеза проводили без промежуточного выделения нуклеозидфосфазолидов. Исходные нуклеозид-5'-фосфаты активировали как указано выше, причем активацию карбонилбисимидазолом (IIа) и карбонилбистриазолом (IIв) проводили без прибавления N-метилимидазола, а взаимодействие с карбонилбисбензимидазолом (IIб) и карбонилбисбензотриазолом (IIг) — в присутствии 6 экв. N-метилимидазола. Далее, после разложения избытка активирующего реагента метанолом и удаления растворителей в вакууме к остатку прибавляли раствор 2 экв. бистриэтиламмониевой соли α -D-глюкопиранозилфосфата в смеси абс. DMF — абс. DMSO (1:1) (схема 3). Протекание реакции пирофосфатного синтеза при 20°С в этих условиях нами было исследовано на примере синтеза уридиндифосфатглюкозы в присутствии 6 или 12 экв. N-метилимидазола. В табл. 4 приведены выходы уридиндифосфатглюкозы (XV) через 24, 48 и 72 ч после начала реакции, определенные после выделения этого соединения препаративным электрофорезом на бумаге; выход определяли по поглощению элюата при 262 нм.

Исследование пирофосфатного синтеза в случае производных цитидин-5'-фосфата (Iб) и гуанозин-5'-фосфата (Iв) проводили аналогично при продолжительности реакции 72 ч (табл. 5 и 6).

Строение полученных веществ было подтверждено УФ-спектрами и данными электрофореза (подвижность относительно соответствующих нуклеотидов ~0,8). Кислотный гидролиз полученных нуклеозиддифосфат-

Получение уридиндифосфатглюкозы (XV) из уридин-5'-фосфата (Ia)

Активирующий реагент	Дополнительное количество MeIm, моль/моль (Ia)	Выход соединения (XV) (%) через		
		24 ч	48 ч	72 ч
IIa	—	60	86	95
	6	60	87	95
	12	61	89	95
IIб+6 моль MeIm	—	43	61	78
	6	47	66	85
	12	51	70	89
IIв	—	40	56	72
	6	48	65	81
	12	57	73	88
IIг+6 моль MeIm	—	35	49	64
	6	49	64	79
	12	64	77	92

Таблица 5

Получение цитидиндифосфатглюкозы (XVI) из цитидин-5'-фосфата (Iб)

Активирующий реагент	Количество MeIm, моль/моль (Iб), для активации нуклеотида (Iб)	Время активации СМР (Iб), ч	Выход соединения (XVI), % *
IIa	—	9	89
IIб	—	40	48
	6	23	68
IIв	—	5	81
IIг	—	18	45
	—	8	60

* Время реакции 72 ч.

Таблица 6

Получение гуанозиндифосфатглюкозы (XVII) из гуанозин-5'-фосфата (Iв)

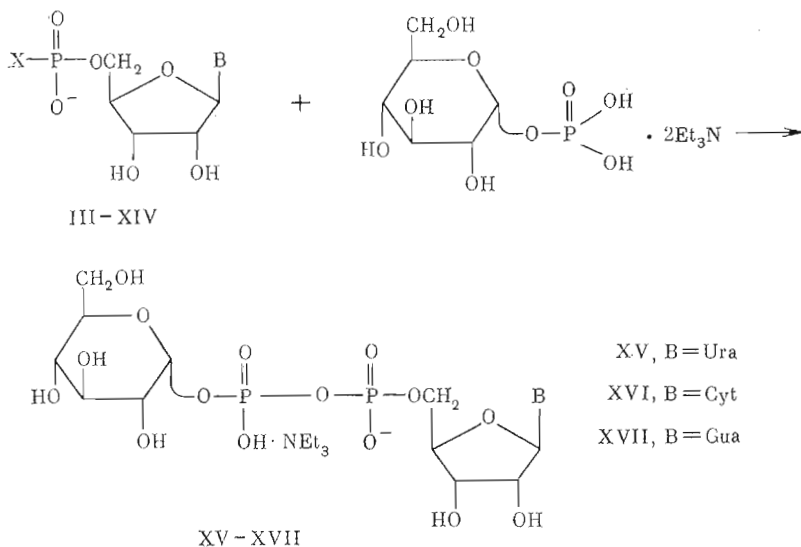
Активирующий реагент	Количество MeIm, моль/моль (Iв), для активации нуклеотида (Iв)	Время активации ГМР (Iв), ч	Выход соединения (XVII), % *
IIa	—	3,5	72
IIб	—	23	41
	6	18	59
IIв	—	2	67
IIг	—	8	38
	6	3,5	53

* Время реакции 72 ч.

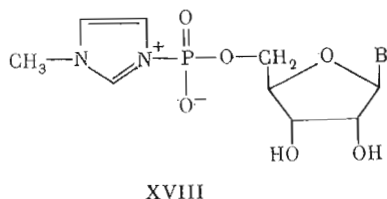
сахаров (XV)–(XVII) (0,1 н. HCl, 100° С, 15 мин) приводил к образованию глюкозы и соответствующего нуклеозиддифосфата (идентификация по ТСХ с известными образцами). Соотношение нуклеозид (по УФ-поглощению) – общий фосфат (P_{общ}) – кислотлабильный фосфат (P_{кл}) для соединений (XV)–(XVII) было близко к теоретическому (1:2:1) (аналитические методики см. [9]).

Представленные экспериментальные данные (табл. 4–6) свидетельствуют о том, что в отсутствие N-метилимидазола реакционная способность нуклеозид-5'-фосфатов в реакции пирофосфатного синтеза убывает в ряду: имидазолид > бензимидазолид > триазолид > бензотриазолид, что соответствует ряду убывания основных свойств азолов (pK_а, соответ-

Схема 3



ственно 6,95; 5,53; 2,30; 1,60). Можно предположить, что скорость реакции в этом случае определяется степенью протонирования нуклеозид-5'-фосфазолидов на стадии, предшествующей атаке фосфомоноэфирного атома кислорода по атому фосфора, несущему остаток азота, с образованием пиродифосфатной связи. Добавление N-метилимидазола не оказывает заметного влияния на реакционную способность имидазолида, но повышает скорость реакции с другими азолидами. Это связано, по-видимому, с тем, что N-метилимидазол функционирует как нуклеофильный катализатор реакции с промежуточным образованием высокорекционноспособного цвиттер-ионного производного (XVIII); можно ожидать, что по реакци-



онной способности последний близок к протонированному фосфоимидазолиду.

Представленные в данной работе результаты показывают, что введение в реакционную смесь N-метилимидазола позволит успешно использовать относительно стабильные N,N'-карбонилбисазолы — производные бензимидазола и бензотриазола — для синтеза нуклеозид-5'-фосфазолидов и их последующего превращения в нуклеозиддифосфатахара. Такой подход может быть особенно полезен при выполнении синтеза с микроколичествами нуклеотидов.

Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию проводили на силуфоле UV₂₅₄ (Kavalier) в системе PrOH — 25% водн. NH₃ — H₂O 8 : 1 : 1 (A) или на силикагеле F₂₅₄ в системе CHCl₃ — MeOH — 0,5 M AcONH₄ — AcOH, 5 : 10 : 4 : 2 (B), обнаруживая соединения по УФ-поглощению, а в системе B, кроме того, — молибдатным реактивом на фосфат [10] с последующим прокаливанием. Электрофорез проводили на бумаге FN-11 в 0,05 M TEAB, pH 7,5, обнаруживая соответствующие зоны по УФ-поглощению и с помощью реагента на фосфор [11]; электрофоретическую подвижность (*E*_{NMP}) определяли относительно соответствующих нуклеотидов. Иовообменную хроматографию проводили на DEAE-целлюлозе DE-52 (HCO₃⁻) (Whatman), контролируя элюцию при 254 нм на приборе Uvicord (LKB). Кислотолабильный и общий фосфат определяли как в работе [9]. УФ-спектры снимали на приборах Specord и CF-25 в воде, спектры ³¹P-

ЯМР — на приборе Bruker AM-300 (121,5 МГц) в D₂O и DMF с 85% H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта. Кислотный гидролиз проводили 0,1 н. HCl при 100° С в течение 15 мин.

Нуклеозид-5'-фосфазолиды (III) — (XIV). Нуклеозид-5'-фосфат (50 мкмоль, Ia и Ib — в виде бистриэтиламмониевой соли, Ic — в виде метилтриоктиламмониевой соли, 0,1 М раствор в абс. DMF) обрабатывали при 0° С 200 мкмоль соответствующего кристаллического N,N'-карбонилбисазола (IIa—г), добавляя в указанных в табл. 4—6 случаях соответствующее количество N-метилмидазола. По окончании реакции прибавляли 50 мкл метанола, через 10 мин разбавляли водой до 10 мл и наносили на колонку (3,5×19 см) с DEAE-целлюлозой, промывали 200 мл воды (в случае бензимидазолидов и бензотриазолидов — 50% водным спиртом) и элюировали линейным градиентом TEAB (0—0,05 М, по 300 мл), собирая фракции при концентрации соли 0,04—0,045 М в виде единственного пика, содержащего фосфазолид (ТСХ в системе А; электрофорез). TEAB удаляли последовательной отгонкой с водой и метанолом и получали нуклеозид-5'-фосфазолиды (III) — (XIV) в виде триэтиламмониевых солей. УФ-спектры полученных соединений см. в табл. 2, подвижность при хроматографии и электрофорезе — в табл. 4. Спектр ³¹P-ЯМР соединения (VI), δ, м. д.: -8,76 (D₂O), -9,38 (DMF). При кислотном гидролизе соединений (III) — (XIV) получали соответствующие нуклеозид-5'-фосфаты (Ia—в), E_{НМР} 1,0.

Уридиндифосфат глюкоза (XV). Уридин-5'-фосфат (Ia, бистриэтиламмониевая соль, 60 мкмоль, 0,1 М раствор в абс. DMF) обрабатывали при 0° С в течение соответствующего промежутка времени N,N'-карбонилбисазолами (240 мкмоль): (IIa) или (IIв) в отсутствие N-метилмидазола (см. табл. 1) или же (IIб) или (IIг) в присутствии 6 экв. N-метилмидазола (см. табл. 3). Прибавляли 50 мкл метанола для разложения избытка активирующего реагента, через 10 мин при 20° С растворители удаляли в вакууме масляного насоса. К остатку прибавляли 2,4 мл 0,05 М раствора (120 мкмоль) бистриэтиламмониевой соли α-D-глюкопиранозилфосфата в смеси DMF—DMSO, 1:1. Полученный раствор разделяли на три части, в первую из которых N-метилмидазол вообще не добавляли, во вторую добавили 6 экв. (10 мкл), в третью — 12 экв. (20 мкл). Через 24, 48 и 72 ч при 20° С из всех трех смесей аликвоты наносили на бумагу, препаративным электрофорезом выделяли зону, соответствующую по подвижности заведомому образцу уридиндифосфат-глюкозы (E_{СМР} 0,80), элюировали полученное соединение (XV), R_f 0,45 (Б), и определяли его количество по поглощению при 262 нм (см. табл. 4). Отношение уридин — P_{общ} — P_{кп} 1:2,05:1 (теор. 1:2:1). Кислотный гидролиз соединения (XV) приводит к смеси глюкозы (R_f 0,73 (Б)) и уридиндифосфата (R_f 0,12 (Б)).

Цитидиндифосфат глюкоза (XVI). Цитидин-5'-фосфат (Iб, метилтриоктиламмониевая соль, 50 мкмоль, 0,1 М раствор в абс. DMF) обрабатывали при 0° С в течение соответствующего промежутка времени N,N'-карбонилбисазолами (200 мкмоль): (IIa) или (IIв) в отсутствие N-метилмидазола или же (IIб) или (IIг) в присутствии 6 экв. (25 мкл) N-метилмидазола (см. табл. 5). К реакционной смеси прибавляли 50 мкл метанола для разложения избытка активирующего реагента, растворители удаляли в вакууме, к остатку прибавляли 0,05 М раствор 100 мкмоль (2 мл) бистриэтиламмониевой соли α-D-глюкопиранозилфосфата в смеси абс. DMF — абс. DMSO, 1:1. Через 72 ч аликвоту реакционной смеси наносили на бумагу и подвергали препаративному электрофорезу, выделяли зону, соответствующую по подвижности заведомому образцу цитидиндифосфат-глюкозы (E_{СМР} 0,80), элюировали и определяли количество продукта (XVI) по поглощению при 272 нм. Полученное соединение имело отношение цитидин — P_{общ} — P_{кп} 1:1,96:0,97. В результате кислотного гидролиза соединение (XVI) (R_f 0,35) превращалась в смесь глюкозы (R_f 0,73, Б) и цитидиндифосфата (R_f 0,05, Б).

Гуанозиндифосфат глюкоза (XVII). Гуанозин-5'-фосфат (Iв, бистриэтиламмониевая соль, 50 мкмоль, 0,1 М раствор в DMF) обрабатывали

аналогично предыдущему опыту (результаты см. в табл. 6). Выход соединения (XVII) определяли после элюции зоны электрофореза на бумаге, соответствующей заведомому образцу гуанозиндифосфатглюкозы (E_{GMP} 0,80), по поглощению при 252 нм. Полученное соединение имело отношение гуанозин — $P_{общ}$ — $P_{кт}$ 1 : 1,97 : 0,98. Кислотный гидролиз соединения (XVII), (R_f 0,29, Б) приводил к смеси глюкозы (R_f 0,73, Б) и гуанозиндифосфата (R_f 0,00, Б).

Авторы благодарят А. В. Игнатенко за съемку спектров ^{31}P -ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лалетина З. П., Пурьгин П. П., Данилов Л. Л., Шibaев В. И. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 565—566.
2. Kochetkov N. K., Shibaev V. N. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1973, v. 28, p. 307—399.
3. Шibaев В. И., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1973, № 9, с. 2095—2099.
4. Пурьгин П. П., Колодкина И. И., Конькова Е. П., Юркевич А. М. Хим.-фармацевт. журн., 1983, № 10, с. 1235—1237.
5. van Montagu M., Molemans F., Stockx J. Bull. Soc. chim. belg., 1968, v. 77, № 3—4, p. 171—180.
6. Viscontini M., Hoch D., Karrer P. Helv. chim. acta, 1955, v. 38, № 3, p. 642—645.
7. Пурьгин П. П., Лалетина З. П., Силицына И. К., Шibaев В. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1983, № 7, с. 1676—1678.
8. Папчишин А. В., Пурьгин П. П. В кн.: Строение и свойства молекул/Ред. Терентьев В. А. Изд-во Куйбышевского ун-та, 1983, с. 110—115.
9. Шibaев В. И., Елисеева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 376—380.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
11. Hanes C. S., Isherwood F. A. Nature, 1949, v. 164, № 4183, p. 1107—1109.

Поступила в редакцию
31. III. 1986

USE OF N,N'-CARBONYL-BIS-AZOLES FOR SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE SUGARS AND INFLUENCE OF N-METHYLIMIDAZOLE ON THE PROCESS

BELOUSOVA Z. P., PURYGIN P. P., DANILOV L. L. *, SHIBAIEV V. N. *

Kuibyshev State University; * N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Reactivity of N,N'-carbonyl-bis-imidazole, -benzimidazole, -triazole and -benzotriazole in the reaction with 5'-phosphates of uridine, cytidine and guanosine was investigated. The rate of nucleoside phosphoazolidate synthesis increased with increase of positive charge on carbon atom of C=O group in carbonyl-bis-azole and was highest for the triazole derivatives. The reaction rate for N,N'-carbonyl-bis-benzotriazole and -benzimidazole was significantly lower but could be increased by addition of excess of N-methylimidazole. Uridine diphosphate glucose, cytidine diphosphate glucose and guanosine diphosphate glucose were prepared through reaction of nucleoside 5'-phosphoazolidates with glucose-1-phosphate in high yields. The rate of pyrophosphate synthesis depends on nature of azole residue and can be increased by addition of N-methylimidazole.