



УДК 547.241.057

ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ХУ*. СИНТЕЗ С-АЦИЛФОСФОНАТНОГО АНАЛОГА АТР И С-ЗАМЕЩЕННЫХ ДИФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ — АНАЛОГОВ ПИРОФОСФАТА

Тыртыш Т. В., Тарусова Н. Б.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы С-замещенные производные метилендифосфоновой кислоты, которые рассматриваются как аналоги пирофосфата, содержащие различные типы функциональных групп: β-карбэтоксиг-α-фосфоэтилфосфоновая и β-оксо-α-фосфонопропилфосфоновая кислоты. В основу синтеза положено алкилирование или ацилирование Na-производного тетраэтилового эфира метилендифосфоновой кислоты с последующим деблокированием фосфонатных групп с помощью Me₃SiBr. β-Оксо-α-фосфонопропилфосфоновою кислоту использовали для синтеза нового фосфонатного аналога АТР.

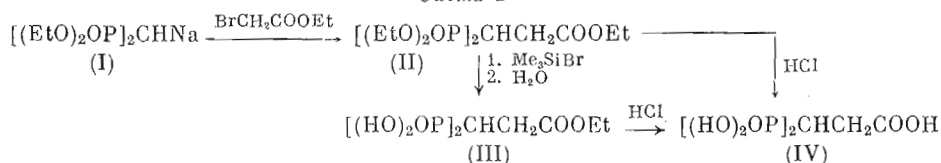
Структурное сходство метилендифосфоновой кислоты (MDP) с пирофосфатом и ее способность участвовать в реакциях, катализируемых некоторыми ферментами, например ДНК- и РНК-полимеразами [2–5], обусловили интерес к ее производным как к соединениям с возможной биологической активностью. Оксиметил-, дихлор-, аминопроизводные MDP изучаются как комплексоны, ингибиторы ферментов, вещества с антивирусной активностью [2]. Производные MDP могут быть использованы и как структурные фрагменты аналогов олигофосфатов различной природы, в том числе метаболически важных нуклеозид-5'-трифосфатов и АТР [6, 7]. Так, фосфонатные аналоги АТР, включающие остаток бромметилдендифосфоновою кислоты, оказались довольно эффективными ингибиторами CoASAc-карбоксилазы млекопитающих [7].

Данные о свойствах С-замещенных производных MDP очень ограничены, поскольку до настоящего времени синтезировано лишь небольшое число таких соединений. Заместители по углеродной группе MDP могут оказать влияние на кислотные свойства фосфонатных групп, конформационную подвижность фосфорсодержащей цепи, способность образовывать комплексы с металлами. В том случае, если замещающие группы обладают химической активностью, содержащие их соединения могут быть интересны как аффинные реагенты при энзимологических исследованиях.

В соответствии с этим нас интересовала возможность синтеза С-производных MDP с новыми типами функциональных групп, например соединения (III) и (VIII), их химические свойства, доступность их производных.

Полный эфир (II) был получен алкилированием тетраэтилового эфира Na-соли MDP (I) (см. схему 1) по методике [8] и очищен на силикагеле. Обработка вещества (II) Me₃SiBr и далее водой или спиртом приводила к расщеплению фосфонэфирных связей и не затрагивала сложноэфирную группу.

Схема 1

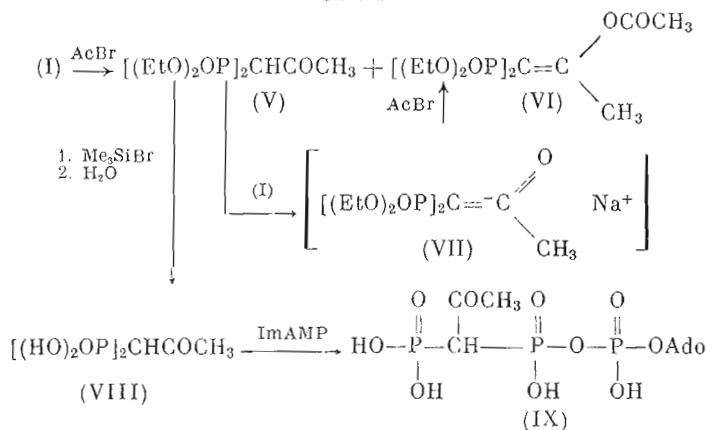


* Сообщение XIV см. [1]. Сокращения: MDP – метилендифосфоновая кислота, Im – имидазolid, THF – тетрагидрофуран.

Сложноэфирную группу в соединении (III) не удавалось омылить щелочью или водным аммиаком, однако кислый гидролиз приводил к кислоте (IV), полученной ранее [8] непосредственно из эфира (II). Структура β -карбоксо- α -фосфоэтилфосфоновой кислоты (III) была подтверждена данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР-, а также ИК-спектроскопии.

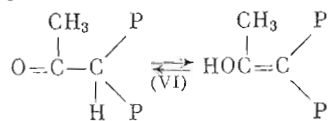
Более сложным оказалось получение С-ацильного производного (VIII) (схема 2).

Схема 2



При добавлении ацетилбромида к раствору Na-соли (I) в THF при -10°C ацилирование проходило с низким выходом. Основными продуктами реакции были эфир β -оксо- α -фосфонопропилфосфоновой кислоты (V) и еще одно вещество, которому на основании данных ЯМР-спектроскопии была приписана структура ацетилированного енола (VI). Мы предположили, что это соединение могло образоваться при ацилировании енолята (VII), продукта побочной реакции обмена между эфиром (V) и солью (I) в условиях избытка последней. Возможность подобных реакций диспропорционирования в ряду производных дифосфонатов отмечалась ранее [8]. Изменив порядок прибавления реагентов, нам удалось повысить выход эфира (V) до 50% и существенно снизить выход побочного продукта (VI).

В спектре ^1H -ЯМР эфира (V) сигналы протонов ацетильной группы представляют собой два синглета при 2,25 и 2,31 м.д., причем последний имеет тонкую структуру, обусловленную, по-видимому, заторможенностью вращения вокруг C—C-связей. Спектр ^{31}P -ЯМР этого соединения содержал два дублета при 19,53 и 26,63 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия 37 Гц и синглет при 14,48 м.д. На основании этих данных можно предположить существование двух таутомерных форм эфира (V) с приблизительным соотношением (по интегральным параметрам) кетонной и енольной форм 2 : 3.



Соединение (VI) имело в спектре ^1H -ЯМР сигнал с тонким расщеплением при 2,13 м.д. и синглет при 2,42 м.д., который исчезал при мягкой щелочной обработке. Эти сигналы отнесены к двум типам метильных групп в соединении (VI). Конечный спектр после отщепления ацетильной группы соответствовал спектру эфира (V).

После удаления эфирных групп с помощью триметилбромсилана в ^1H -ЯМР-спектре соединения (VIII) при pH 7 не наблюдалось расщепления сигнала протонов метильной группы, а спектр ^{31}P -ЯМР содержал только синглет при 10,7 м.д. для ядер фосфора, принадлежащих, по-видимому, кетоформе соединения (VIII).

Дифосфонат (VIII) был использован для синтеза нового аналога АТР (IX). Из фосфонатных аналогов АТР, имеющих электроотрицательные

заместители по углероду фосфонатного фрагмента, известны лишь галогеопронизводные [6, 7]. Отмечалось влияние такого замещения на кислотные и комплексообразующие свойства аналогов АТР [6], а также эффекты повышения сродства некоторых аналогов АТР к ферментам по сравнению с метиленовыми аналогами АТР [7].

Аналог АТР (IX) мы синтезировали имидазольным методом, уже применявшимся в синтезе фосфонатных аналогов АТР [1].

Структура соединения (IX) подтверждена данными спектров ^1H - и ^{31}P -ЯМР. Химические сдвиги для ядер фосфора фосфонатного фрагмента, а также значения констант спин-спинового взаимодействия были такими же, как и для других аналогов АТР, имеющих электроотрицательный заместитель (F, Cl, Cl_2 , Br) в остатке дифосфоновой кислоты [6, 7].

Экспериментальная часть

В работе использовали AMP (Reanal, ВНР), MDP синтезировали по методике [9], Me_3SiBr — по методике [10].

ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (Cavalier, ЧССР) и пластинках с РЕИ-целлюлозой F (Merck, ФРГ). Системы для ТСХ на силикагеле: бензол — ацетон, 1:1 (А); MeOH — CF_3COOH — NH_4OH — H_2O , 6:0,05:1,5:2,45 (Б). Для препаративной хроматографии применяли силикагель L 40/100 (Chemapol, ЧССР) и целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия). Для очистки веществ от парамагнитных примесей использовали смолу Chellex-100 (Bio-Rad, США), для очистки воды — смолу Elga (Англия).

Температуры плавления определяли на приборе РНМК (ГДР). УФ-спектры регистрировали на приборе Ultraspec 4050 (ЛКВ, Швеция), ИК-спектры — на спектрофотометре IR-Specord (ГДР) в вазелиновом масле, ЯМР-спектры — на приборе Varian XL-100-15 (США). ^{31}P -ЯМР-спектры сняты с подавлением расщепления на протонах. В качестве стандартов использованы: тетраметилсилан и *трет*-бутанол (внутренние), 85% H_3PO_4 (внешний стандарт).

Тетраэтиловый эфир β-карбэтокси-α-фосфоноэтилфосфоновой кислоты (II) был получен по методике [8] и очищен хроматографией на силикагеле (колонка 8×20 см) в системе бензол — ацетон, 5:1 (300 мл) и 1:1 (300 мл), R_f 0,45 (А). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ, м. д.): 1,08 т (3H, CH_3), 1,14 т (12H, CH_2), J 7 Гц; 2,6 м (3H, CHCH_2), 3,95 м (10H, CH_2). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 2980, 1750, 1400, 1250, 1160, 1020.

β-Карбэтокси-α-фосфоноэтилфосфоновая кислота (III). К 3,7 г (10 ммоль) эфира (II) приливали 10 мл Me_3SiBr , перемешивали 48 ч при 20° С, упаривали в вакууме, к остатку добавляли 5 мл воды, экстрагировали эфиром (3×3 мл), водный слой упаривали. Выход кислоты (III) 2,4 г (92%), R_f 0,4 (Б). Анилищевая соль, т.пл. 134–136° С; Na-соль, т.пл. 250–252° С. ^1H -ЯМР-спектр (D_2O , δ, м. д.): 1,3 т (3H, CH_3), 2,5 м (3H, CHCH_2), 4,2 к (2H, CH_2), J 7 Гц. Спектр ^{31}P -ЯМР (D_2O , δ, м. д.): 18,74. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1720, 1450, 1230, 1150, 1050.

β-Карбэкси-α-фосфоноэтилфосфоновая кислота (IV). Гидролизовали 0,2 г эфира (III) 25% водным HCl (7 ч при кипении), упаривали и сушили над NaOH. По величине R_f (0,3, Б) и ^1H -ЯМР-спектру вещество идентично образцу, полученному по методу [8].

Тетраэтиловый эфир β-оксо-α-фосфонопропилфосфоновой кислоты (V). Раствор Na-соли (I), полученной из 3 г (10 ммоль) тетраэтилового эфира MDP и 0,3 г (12 ммоль) NaN, в 10 мл THF прибавляли в течение 10 мин при –20° С при интенсивном перемешивании в атмосфере инертного газа к 17 г (100 ммоль) ацетилбромида. Избыток ацетилбромида удаляли в вакууме, маслообразный остаток растворяли в хлороформе, осадок NaBr отделяли. Смесь продуктов делили на силикагеле (колонка 8×20 см) в смеси бензола с ацетоном в соотношениях 10:1, 5:1, 1:1 (по 300 мл). После упаривания элюата получили 1,7 г эфира (V) с выходом 50%. R_f 0,45 (А). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ, м. д.): 1,27 т (12H, CH_2), J 7 Гц; 2,25 с и 2,31 с (3H, COCH_3); 4,08 м (9H, CH_2 , CH). ^{31}P -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ, м. д.): 14,48 с; 19,53 д, 26,63 д, J 37 Гц. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 2980, 1700, 1590, 1400, 1250, 1160, 1020. Найдено, %: С 40,28; Н 7,31. $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{P}_2$. Вычислено, %: С 40,01; Н 7,32.

Тетраэтиловый эфир 1-фосфоно-2-ацетоксипропилиден(1,2)-фосфоновой кислоты (VI). К раствору в THF Na-соли (I), полученной из 0,3 г (1 ммоль) тетраэтилового эфира MDP и 0,03 г (1,2 ммоль) NaN, при

–10°С прибавляли 0,34 г (2 ммоль) ацетибромид в течение 30 мин. Смесь разделяли на колонке с силикагелем аналогично предыдущей методике. Выход эфира (VI) 0,09 г (20%), R_f 0,42 (A). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 1,28 т и 1,31 т (12 H, CH₃CH₂); 2,13 с (3 H, CH₃CO); 2,42 м (3 H, CH₃C); 4,02 м (9 H, CH₂Si₃, CH).

β-Оксо-α-фосфонопропилфосфоновая кислота (VIII). 3,3 г (10 ммоль) эфира (V) растворяли в 10 мл Me₃SiBr, раствор перемешивали 48 ч при 20°С. После удаления в вакууме избытка Me₃SiBr обработку проводили аналогично методике получения дифосфоната (III). Выход кислоты (VIII) в виде масла 2 г (92%); анилиновая соль, т.пл. 122–124°С; Na-соль, т.пл. 172–174°С. ¹H-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 2,72 с (3 H, CH₃); ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 10,7. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 2900, 1700, 1450, 1350, 1270, 1200, 1150, 1060.

Аденозил-5'-фосфо-(β-оксо-α-фосфонопропил)фосфонат (IX). К 1,1 г (5 ммоль) соединения (VIII) в абс. MeOH прибавляли 1,85 г трибутил-амин, метанол удаляли упариванием в вакууме, остаток растворяли в 30 мл абс. HCONMe₂, добавляли к раствору 1 ммоль имидазолида AMP [11] и перемешивали 48 ч при 20°С. Раствор разбавляли водой до 0,5 л (рН 7,5) и хроматографировали на колонке с DE-32 (5×40 см) в градиенте концентрации (0,1–0,5 M) триэтиламмонийкарбоната, рН 7,5. УФ-поглощающие фракции, элюированные 0,36–0,40 M буфером, упаривали в вакууме, 2–3 раза упаривали с водой и спиртом для обессоливания. Продукт дополнительно очищали на колонке с сефадексом G10 (2×50 см) в воде, а также на колонке с даурксом 50W×8 (H⁺-форма, 1×5 см), элюат нейтрализовали NH₄OH и лиофильно высушивали. Выход 102 мг (20%), R_f 0,62 (силуфол, B), 0,42 (PEI-целлюлоза, 1 M LiCl). УФ-спектр: λ_{max} 260 нм (ε 15 000). ¹H-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 2,34 с (3 H, CH₃); 4–4,8 (6 H, РСНР, Н2', Н3', Н4', 2Н5'); 6,1 д (1 H, Н1', J 5 Гц); 8,16 с (1 H, Н2); 8,44 с (1 H, Н8). ³¹P-ЯМР-спектр: –9,9 д (P^α); 0,77 к (P^β); 9,13 д (P^γ); J_{α,β} 26,4 Гц, J_{β,γ} 12,4 Гц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусова Н. Б., Завгородний С. Г., Осипова Т. И. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 802–806.
2. Вельгичев Ю. Е., Юрьева В. А., Архипова О. Г., Кабачник М. И., Медведь Т. Я. Вопр. мед. химии, 1975, т. 21, № 5, с. 451–462.
3. Nordenfelt E., Oberg B., Helgstrand E., Miller E. Acta pathol. microbiol. scand. Sect. B, 1980, v. 88, № 1, p. 165–169.
4. Hutchinson D. W., Cload P. A., Haugh M. C. Phosphorus and Sulfur, 1983, v. 14, № 3, p. 285–293.
5. Розовская Т. А., Ченчик А. А., Тарусова Н. Б., Библиашвили Р. Ш., Хомутов Р. М. Молекуляр. биология, 1981, т. 15, № 6, с. 1205–1223.
6. Blackburn G. M., Kent D. E., Kolkman F. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1984, № 5, p. 1119–1125.
7. Бирюков А. И., Тарусова Н. Б., Амонгов С. И., Горяченко Е. В., Рабишков А. Г. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 598–604.
8. Qimby O. T., Curry J. D., Nicholson D. A., Prentice J. B. Roy C. H. J. Organomet. Chem., 1968, v. 13, № 1, p. 199–207.
9. Cade J. A. J. Chem. Soc., 1959, № 6, p. 2266–2275.
10. Morita T., Okamoto J., Sakurai H. Bull. Chem. Soc. Japan, 1980, v. 51, № 7, p. 2163.
11. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Бирюков А. И., Ишмуратов Б. Х. Биоорг. химия, 1970, т. 5, № 1, с. 56–63.

Поступила в редакцию 17.I.1986

После доработки 28.II.1986

ORGANOPHOSPHOROUS ANALOGUES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS XV. SYNTHESIS OF C-ACYLPHOSPHONATE ATP ANALOGUE AND OF C-SUBSTITUTED DIPHOSPHONATES, THE PYROPHOSPHATE ANALOGUES

TYRTYSH T. V., TARUSSOVA N. B.

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

Two C-substituted derivatives of methylenediphosphonate (I) with different functional groups: β-carbethoxy-α-phosphonoethylphosphonate (II) and β-keto-α-phosphono-propylphosphonate (III) were prepared by alkylation or acylation of tetraethyl ester of (I) (Na-salt); the phosphonate esters were cleaved using Me₃SiBr. A new ATP analogue was synthesized from AMP and diphosphonate (III). ¹H- and ³¹P-NMR spectra were employed for characterization of new compounds.