Рибозимомиметично фосфонилиране на захари и аминокиселини

Станислав Байрямов

Ribozyme-mimetic phosphonylation of sugars and amino acids: *In this paper we describe the procedure for synthesis of phosphonylated sugars and phosphonylated amino acids by the present protocols for the preparation of O-phosphonylated glucose and N-phosphonylated alanine as model compounds and in particular, as drug candidates in pharmacy and medicine. This protocol and methodology in general, imitates the activation of alpha-amino acids and sugars, describing the crucial role of ribozymes, playing the role as enzymes in these key processes during the Ancient RNA-World. Their activation by phosphorylation initiates the participation of these molecules in the key biochemical processes of biosynthesis and biodegradation (biodisintegration).*

Key words: *Phosphonic acid (phosphorus oxo acid), 1,2-propylene oxide (iso-propylene oxide, methyl oxirane), L-alanine, D-glucose (D-glucopyranose),* ***PANCA*** *(****HPANCA****), Ribozyme-mimetic phosphonylation.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Фосфорилирането на различни органични молекули има изключително важно значение в биохимията, както и за създаването на лекарствени средства на тяхна основа, намиращи приложение във фармацевтичната индустрия и медицината. Тъй като по този начин голяма част от молекулите се активират в организма, фосфорилирането на дадена биомолекула позволява встъпването ѝ в даден метаболитен път или цикъл: катаболитен или анаболитен. Освен това създаването (дизайн и синтез) на фосфорилирани молекули като миметици би позволило за разкриване на нови неразгадани биохимични механизми, както и би спомогнало да се синтезират нови лекарствени средства на тази основа.

ИЗЛОЖЕНИЕ

В частност фосфорилирането на захари и аминокиселини играе огромна роля в техния метаболизъм, напр. фосфорилирането на аминокиселини играе важна роля в техния катаболизъм (разграждане на белтъци и аминокиселини), както и анаболизъм (биосинтез); а фосфорилирането на захари например е част от т.нар. гликолитичен обменен път (разграждане на глюкозата), както и пентозофосфатния цикъл (биосинтез на захариди) и пътя на Льолоар, при който се биосинтезират въглехидрати. От своя страна фосфонилирането позволява да се създаде фосфорилирана молекула чрез окисление на съответния Н-фосфонат, както и да се синтезират аналози с модифицирана фосфатна връзка. Например фосфонилирането чрез Н-фосфонати при Н-фосфонатния метод за синтез на олигонуклеотиди позволява да се синтезират аналози с модифицирана междунуклеотидна връзка [1]. Освен това фосфонилирането е по-бързо от фосфорилирането и по този начин се създават условия за по-бързото протичане на дадена реакция, а в много случаи и повишаване на добивите. Tzokov S. B. и сътр. фосфонилират и фосфорилират 3'-OH групата в 2'-деоксирибозния пръстен на 5'-диметокситритилиран тимидин, както и 1'-OH групата на α-D-глюкозата, като по този начин показват реалните възможности за фосфонилиране и фосфорилиране на захари [2]. Също така Tzokov S. B., Devedjiev, I. T. и Petkov, D. D. показват, че комбинацията от 1,2-пропиленов окис и фосфинова киселина (хипофосфориста киселина) при определени условия води до регио- и стереоселективно получаване на гликозил-фосфинови киселини [3]. Тези условия са: еквимоларни количества гликоза, кристална фосфинова киселина и 1,2-пропиленов окис, като реакцията протича в сух диоксан за около 1 час при нагряване при температура 40-60^{0}C. По този начин успешно се синтезират неизостерни фосфинатни аналози на природните гликозил фосфати с модифицирана връзка. Деведжиев и сътр. доказват, че фосфинова киселина и оксирани (епоксиди) в присъствие на алифатни алкохоли

реагират през 2-хидроксиалкил фосфинат и вероятно през алкилфосфинат, даващи алкилфосфинови киселини почти в количествени добиви [4, 5]. При условията, представени в настояшата работа се използват фосфонова киселина и двукратен излишък на изопропиленов окис (метилоксиран) с цел – синтез на бис-2-хидроксипропил Н-фосфонат (фосфонилиращ агент), който реагира с аминокиселина (in situ) или с глюкоза (in situ или чрез предварително изолиране) до получаването на фосфонилните им производни.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

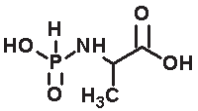
^{1}H и ^{13}C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки BBO или TBI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на ^{1}H и ^{13}C NMR спектрите са извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обърнатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C–H) корелации (HSQC and HMBC).

Крайните продукти бяха определени чрез елементен анализ, използвайки автоматични анализатори: Carlo Erba Elemental Analyzer Model 1106 (Carlo Erba, Milan, Italy) и Perkin-Elmer Elemental Analyzer Model 240 (Perkin-Elmer Corp.,Norwalk, Connecticut).

Обща опитна процедура за получаване на N-фосфонилирани аминокиселини (Фиг.1)

Чистата природна алфа-аминокиселина, в случая аланин (0,01 мол, 1екв.) и H_3PO_3 (0,01 мол, 1екв.) се разтварят в смес от CH_3CN/H_2O с енергично разбъркване. След разтварянето на аланина, разтворителят се изпарява, като процедурата с изпаряването се повтаря няколко пъти с използване на сух ацетонитрил и ацетон (съизпаряване) с цел - премахване на следите от влага. Полученото кристално прозрачно масло се разтваря в диоксан. Реакционната смес се изстудява на ледено-солева баня (от -15^{0}C до около -20^{0}C), към която се добавят 2-2,5 еквивалента (0,02-0,025 mol) 1,2-пропиленов окис (метил оксиран) и реакционната смес се оставя при -15^{0}C - -20^{0}C за около 30 мин. След това температурата на реакционната смес се вдига бавно до стайна, като след това сместа се нагрява при 40^{0}C – 60^{0}C за около 50-60 мин. до 3-4 часа. Реакционната смес се изпарява до сухо чрез отдестилиране на диоксана, след което към сухия остатък се добавя вода и отново се нагрява при 40^{0}C – 60^{0}C за около 50-60 мин*. Накрая водата се изпарява и сухият остатък се разтваря в ацетонитрил и се съизпарява няколко пъти за отстраняване на следите от влага. За по-добро пречистване полученият продукт се прекристализира из етанол.

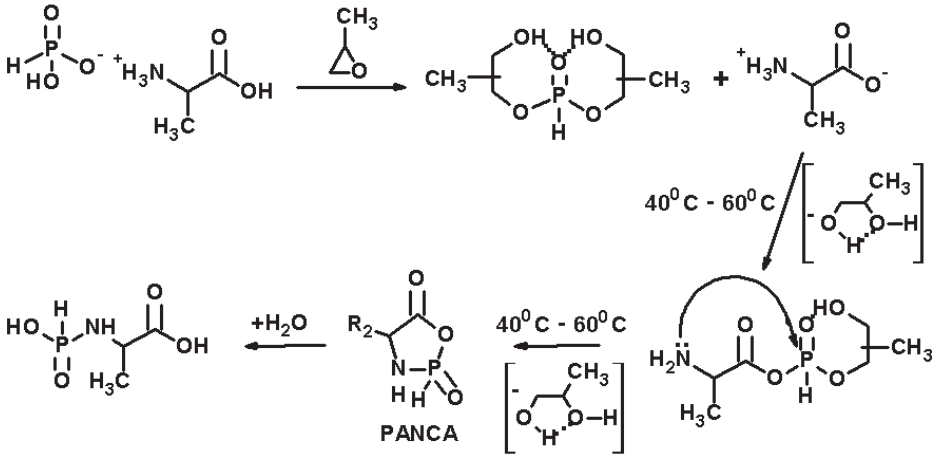
** Водата може да се добави и директно, без да се изпари предварително диоксана, но добивите са малко по-ниски.*



N-фосфонил аланин:

Добив: 43%. ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O, 25°C**):** δ =8.957 (d, $J_{H,P}$=676.9 Hz, 1H, phosphonyl), 8.844 (s, broad, 3H, 2-OH, NH), 8.135 (d, $J_{H,P}$=676.9 Hz, 1H, phosphonyl), 3.793 (m, 1H), 1.492 (d, $J_{CH3,2H}$=8.5 Hz, 3H); Елементен анализ: Anal. Calculated for $C_3H_8NO_4P$: (Mw = 153,07 g/mol); C-23.539%, H-5.268%, N-9.15%; found: C-23.571%, H-5.176%, N-9.072%.

Подобна процедура, се използва за синтез на метилови естери на алфа-аминокиселини [6, 7, 8, 9] и аминоацилиране на захари и нуклеотиди (нуклеозиди) [10]. При синтеза на N-фосфонилирани аминокиселини обаче, се използва вода за разпад на PANCA (HPANCA). Това е причната реакционната смес да се нагрява дълго време до образуване на крайния оксазафосфоланов пръстен.



Фиг.1 Реакционна схема за образуване на N-фосфонилиран аланин през цикличен H-фосфонамид карбоксианхидрид (PANCA или HPANCA).

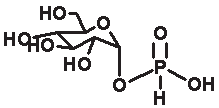
Малко по-различна е процедурата за фосфонилиране на захари, при която вода се добавя на последния етап - за хидролиза на 2-хидроксипропиловия активиран естер на H-фосфоновата киселина, свързана чрез естерна връзка с глюкозата. Освен това температурата за хидролизата на активирания естер е с 10^0C по-ниска.

Обща опитна процедура за получаване на O-фосфонилирани захари (Фиг.2)

Пропиленов окис (0,25 мола, 2,5 екв.) се добавя директно към H_3PO_3 (0,1 мол, 1екв.) в облодънна колбичка от 100 мл. при енергично разбъркване и температура - 20^0C (ледена баня от натрошен лед, примесен с готварска сол). Колбата се запушва с тапа и по този начин се оставя при -20^0C за 1-2 часа. След това съдържанието на колбата се разтваря в сух диоксан и се оставя за 30 мин. при 0^0C, след което температурата бавно се вдига до стайна и се оставя колбата да престои при стайна температура около 1 час. След изтичането на този час към реакционната смес се добавят 0,1 мол (1екв.) глюкоза, разтворена в диоксан▪. След това реакционната смес се оставя на стайна температура за около половин час и се загрява до 50-60^0C за един час. След това диоксанът се изпарява* и сухият остатък се разтваря във вода, като реакционната смес се нагрява при 40-50^0C за 1-2 часа. Водата се изпарява и сухият остатък се разтваря в диоксан и се съизпарява отново няколко пъти с диоксан. За по-добро пречистване полученият продукт се прекристализира из етанол.

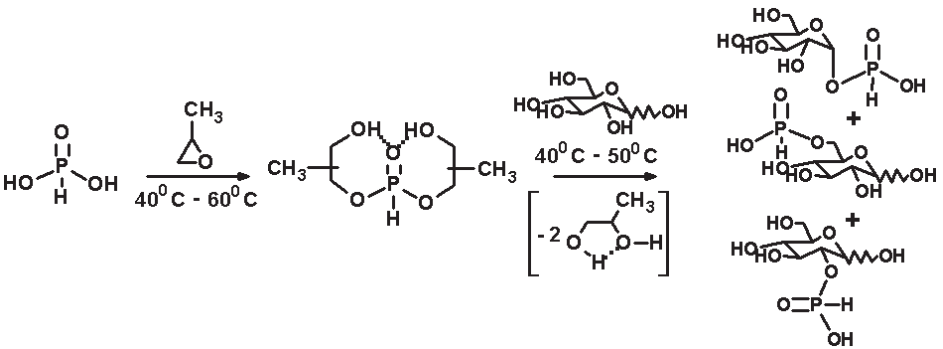
▪ *При недобро разтваряне на захарида в диоксан се използва ултразвукова вана (соникатор) за около 50-60 мин.*

** Водата може да се добави и директно, без да се изпари предварително диоксана, но добивите са малко по-ниски.*



α-1'-O-фосфонил-D-глюкоза:

Добив: 64%. ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O, 25°C): δ =6.892 (d, $J_{H,P}$=672.8 Hz, 1H, H-P), 4.993 (dd, $J_{1',2}$=3.5 Hz, $J_{1',P}$=12.6 Hz, 1H, 1'-H-β), 3.892 (dd, $J_{5',6'a}$=1.5 Hz, $J_{6'a,6'b}$=12.0 Hz, 1H, 6'-Ha), 3.812 (m, 1H, 5'-H), 3.712 (dd, $J_{5',6'b}$=10.6 Hz, $J_{6'a,6'b}$=12.0 Hz, 1H, 6'-Hb), 3.494 (t, $J_{3',4'}$=9.5 Hz, 1H, 3'-H), 3.401 (t, $J_{3',4'}$=9.5 Hz, 1H, 4'-H); 3.382 (t, $J_{2',3}$=7.5 Hz, 1H, 2'-H); Елементен анализ: Anal. Calculated for $C_6H_{13}O_8P$: (Mw = 244,137 g/mol); C-29.518%, H-5.367%; found: C-29.471%, H-5.456%.



Фиг.2. Реакционна схема за образуване на O-фосфонилирана глюкоза

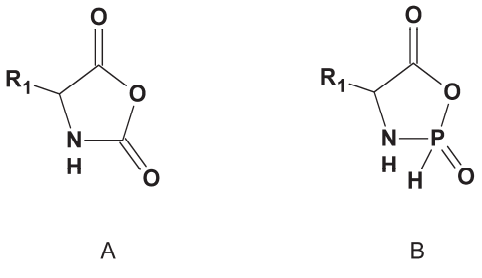
Данните от анализа показват, че за разлика от Tzokov S. B. и сътр., които провеждат реакцията в пиридин [2], като успяват да осъществят успешен стерео- и региоселективен синтез и получават само 1'-O-фосфонилирана α-D-глюкоза, тук не се получава напълно само 1'-O-фосфонилирано производно на α-D-глюкозата добив: 64%, а в малка степен и 2'-O-фосфонил-D-глюкоза (19%), както и 6'-O-фосфонил-D-глюкоза (16%). Разбира се, като следи се наблюдават и 3'- и 4'-O-фосфонилирани производни. Вероятно природата на разтворителя, играещ ролята на реакционна среда оказва своето влияние, като в случая синтезът е осъществен в среда от 1,4-диоксан. В случая обаче е осъществена стереоселективност в реакцията, тъй като полученото 1'-O-фосфонилирано производно е само на α-D-глюкозата. Причината за процентното съотношение между отделните позиционни изомери (наличието на получени 2'- и 6'-O-фосфонилирани производни) се заключава в киселия характер на 2'-OH групата, поради възможността за образуване на водородна връзка с 1'-OH групата в свободната D-глюкоза, както и липсата на пространствено запречване, поради наличието на OH-група при първичен въглероден атом на 6'-позиция, което прави хидроксилната група по-силен нуклеофил.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезирани са O-фосфонилирани производни на глюкозата, използвайки оригиналната процедура за рибозимомиметично фосфонилиране, като с преобладаващ процент се получава α-аномер на 1'-O-фосфонил глюкозата (1'-глюкозил H-фосфонат). В по-малък процент се получава 6'-O-фосфонилиран захарид и в незначителна степен 3'-и 4'-O-фосфонилирана глюкоза.
2. Успешно е осъществено фосфонилиране на алфа-аминогрупата на L-аланин, като реакцията преминава през образуване на смесен анхидрид

(фосфоноанхидрид на аланина: 2-хидроксипропил аминоацил (аланил) H-фосфонат), след това през образуване на 4-метил 2,5-диоксо 1,3-оксаза 2-H 2-фосфолан (H-фосфонамид N-карбоксианхидрид) (PANCA) или (HPANCA)) B, по подобие на уретан-N-карбоксианхидридите (UNCA) A. Нуклеофилната атака от молекула вода води до образуването на N-фосфонилиран аланин.

3. Синтезираните субстрати позволяват да се разшири методиката за получаване на фосфонилирани захари и аминокиселини, намиращи широко приложение във фармацевтичната индустрия.



ЛИТЕРАТУРА

[1] Froehler, C., Ngo, P. G., Matteuci, M. D. Nucleic Acid Res. 1988, 14, 5399.

[2] Tzokov, S. B., Devedjiev, I. T., Bratovanova, E. K., Petkov, D. D. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33 (22), 2302-2303.

[3] Tzokov, S. B., Devedjiev, I. T., Petkov, D. D. J. Org. Chem. 1996, 61, 12-13.

[4] Devedjiev, I. T., Ganev, V., Borisov, G., Zabski, L., Jedlinski, Z. Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements. 1989, 42, 167-170.

[5] Devedjiev, I. T., Borisov, G. Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements. 1990, 53, 37-42.

[6] Videva, V.S., Bairyamov, S.G., Devedjiev, I.T. Bulg. Chem. Commun. 2007, 39, 276.

[7] Devedjiev, I.T., Bairyamov, S.G., Videva, V.S. Heteroatom Chemistry. 2008, 19, 252.

[8] Bayryamov, S.G. НАУЧНИ ТРУДОВЕ на РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ-2010, том 49, серия 9.1, 41 – 48. Русе, 2010 г.

[9] Bayryamov, S.G., Bayryamov, N.G., Danalev, D. L. & Vassilev, N. G. Unpublished results.

[10] Bayryamov, S.G. НАУЧНИ ТРУДОВЕ на РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ-2011, том 50, серия 9.1, 39 – 45. Русе, 2011 г.

За контакти:

Гл. ас. д-р Станислав Байрямов, Катедра “Ремонт, надеждност и химични технологии”, Русенски университет “Ангел Кънчев”, тел.: 082-888 228, 082-888 459, e-mail: sbayryamov@uni-ruse.bg

Докладът е рецензиран.