

## Някои от възможните нежелани странични реакции при провеждането на рибозимомиметичен синтез на метилови естери на природните алфа-аминокиселини. Част II.

Станислав Байрямов

*Some of the possible unwanted side reactions during the ribozyme-mimetic synthesis of methyl esters of the natural alpha-amino acids. Part II: This paper continues to describe some possible undesired side reactions, during the ribozyme-mimetic synthesis of methyl esters of natural alpha-amino acids. Moreover, in this work we prove by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR, the formation of aminoacyl 2-hydroxyalkyl H-phosphonate, followed by H-phosphoramidate N-carboxy anhydride: PANCA (HPANCA), during the reaction, as activated intermediates, susceptible to the nucleophilic attack. These results confirm the proposed by us reaction pathway of ribozyme-mimetic synthesis of methyl esters of the natural amino acids. By the optimization of the reaction conditions, we hope to increase the yields and purity of the desired products as well as we expect to be capable to minimize the undesired side reactions, with side chain functionality participation.*

**Key words:** H-phosphoramidate N-carboxy anhydrides: PANCA (HPANCA), Model reaction, Ribozyme-mimetic synthesis, L-Arg, L-Tyr, L-Trp, L-Asp, L-Glu, Phosphonic acid, Methyl esters, Amino acids, Primordial RNA World.

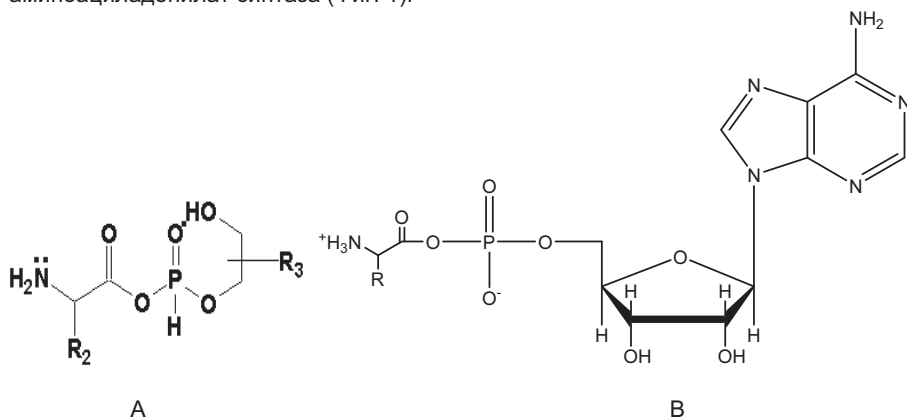
### ВЪВЕДЕНИЕ

Рибозимомиметичният синтез на междубиомономерна връзка е изключително интересен от гледна точка на това, че наподобява синтеза на пептидна връзка в рибозомата, а освен това обяснява огромната роля, която са изиграли РНК-ензимите, преди появата на белтъчните ензими в предшестващия ги РНК-свят. В частност рибозимомиметичният синтез на метилови естери на природните алфа-аминокиселини също наподобява етапите на синтез на белтък [1-4]. Тази стратегия, предложена от авторите се отличава със своята елегантност, меки условия на протичане, провеждането на *one-pot* синтез и използването на евтини реагенти. Недостатъците, както за много други процеси, се заключават в протичането на нежелани странични реакции с участието на различните функционални групи при аминокиселините, водещи до понижаване на добивите, както и усложняване на операцията по изолирането и пречистването на крайния продукт. За да се избегнат тези странични реакции, е необходимо да бъдат променени условията, както и изолирани или ако не е възможно, то поне идентифицирани в хода на реакцията, някои от междинните съединения с цел - тяхното доказване, а оттам и потвърждаване на предполагаемия път на протичане на основната реакция. Това би довело до съставянето на стратегия за контрол на процеса на рибозимомиметичен синтез, а оттам и направляване на реакцията в целевата посока.

### ИЗЛОЖЕНИЕ

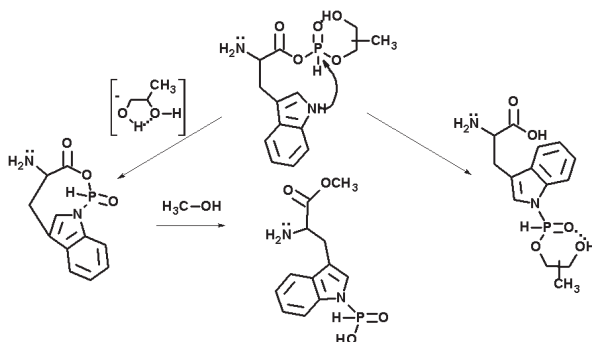
В предишната част от работата по темата за някои от възможните нежелани странични реакции при рибозимомиметичния синтез на метилови естери на природните алфа-аминокиселини беше споменато, че основното предполагаемо активирано съединение, което би трябвало да се получава е цикличният фосфонамид N-карбоксиянхидрид: PANCA (HPANCA). Атаката към неговия карбоксаиден въглероден атом от нуклеофили, каквато е в случая молекулата метанол би довела до неговия разпад с образуване на съответния метилов естер на N-фосфонирираната аминокиселина. Атаката на метаноловата молекула би могла да бъде осъществена и преди образуването на съответния фосфонамид N-карбоксиянхидрид: PANCA (HPANCA), т.е на етапа на образуване на предшестващото съединение: смесен анхидрид на съответната алфа-аминокиселина и 2-хидроксиалкил N-фосфоновата киселина. Това съединение е

също форма на активиране на аминокиселината откъм карбоксилната група, засилващо нейното свойство като електрофил (при карбоксилния въглероден атом). То много наподобява аминокиладенилата, образуващ се в началния стадий (първия етап) на активиране на аминокиселината с помощта на ензима аминокиладенилат синтаза (Фиг. 1):

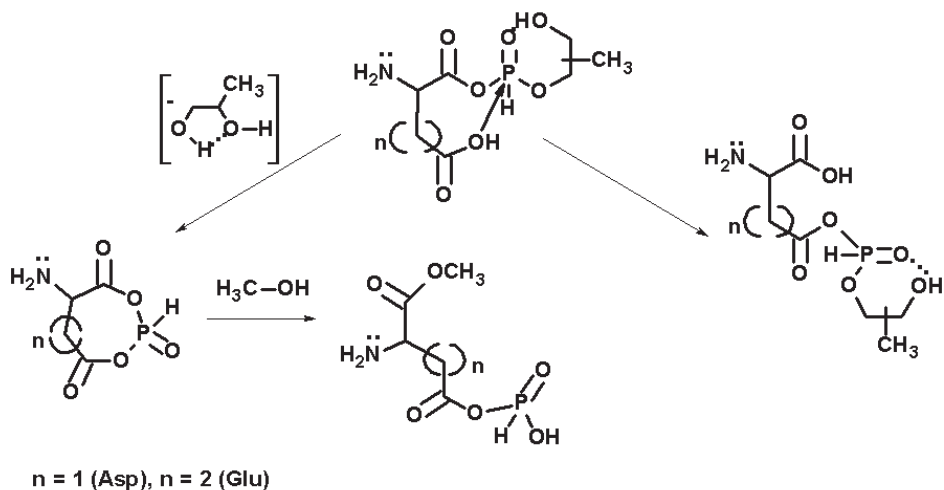


Фиг. 1: Структура на аминокил-2-хидроксиалкил-Н-фосфонат (А) и аминокил аденилат (В)

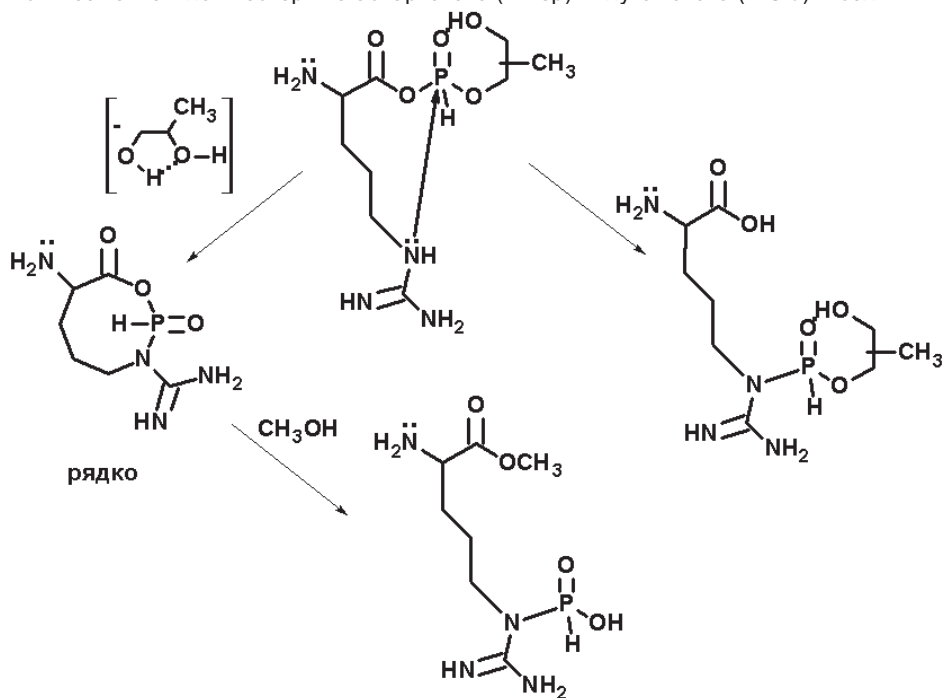
Това активирано съединение (със засилено свойство като електрофил, на въглеродния атом при карбоксилната група) е податливо и на атаката от други нуклеофили, както външни (ОН-групи, NH-групи, NH<sub>2</sub>-групи, SH-групи и др.), така и вътрешни, напр. нуклеофили от страничните функционални групи, което води до редица нежелани реакции с тяхно участие, като понижаването в добивите се дължи напр. на странична реакция на трансфосфониране (пренос на фосфонатна група), като една от нежеланите странични реакции. Такива нуклеофили са редица споменати в предишната част на статията странични функционални групи. Тук ще бъдат представени схематично възможните нежелани странични реакции с участието на гванидиновата група при аргинина (L-Arg), ω-карбоксилните групи (COOH) на аспартовата (L-Asp) и глутамовата (L-Glu) киселини, индолово ядро на триптофана (L-Trp), както и p-ОН група при бензеновото ядро на тирозин (L-Tyr) (Фиг. 2-7)



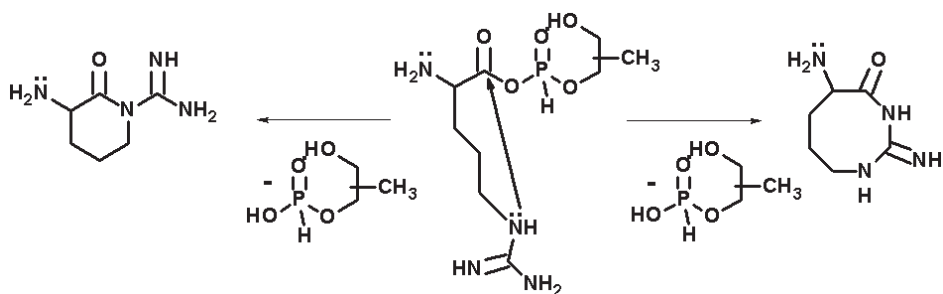
Фиг. 2. Възможни нежелани странични реакции при рибозимомиметичния синтез на метилов естер на триптофана (L-Trp).



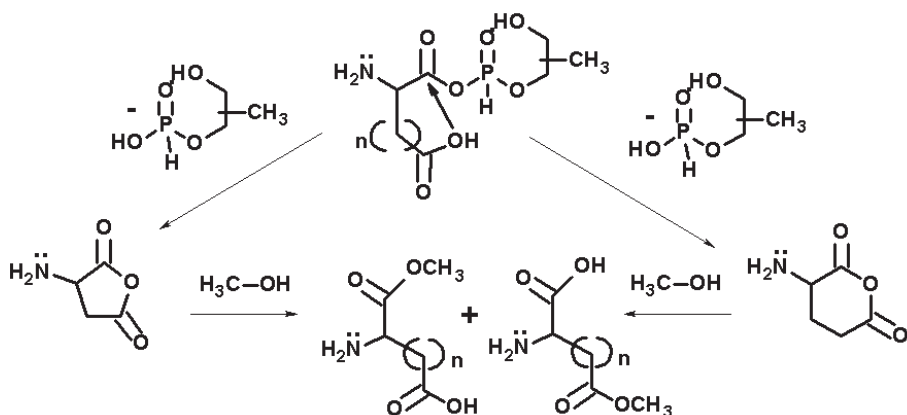
Фиг. 3. Някои от възможните нежелани странични реакции при рибозимомиметичния синтез на метилови естери на аспартовата (L-Asp) и глутамовата (L-Glu) киселини.



Фиг.4. Възможни нежелани странични реакции на трансфосфониране при синтеза на метилов естер на аргинина (L-Arg).

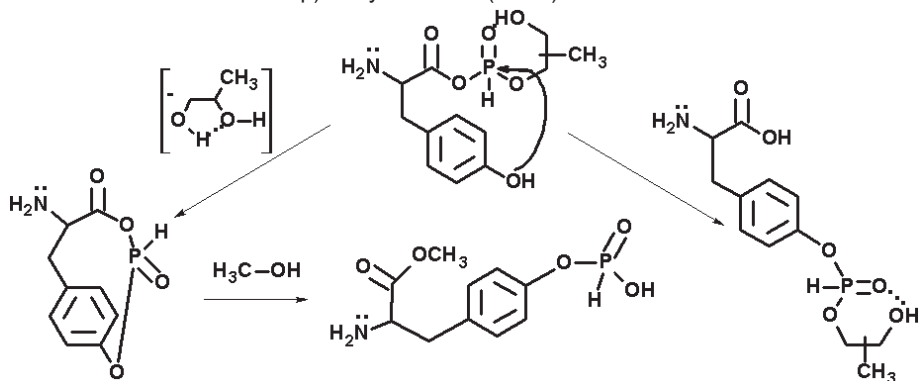


Фиг.5. Възможна нежелана странична реакция на вътрешномолекулна циклизация (лактамизация) при синтеза на метилов естер на аргинина (L-Arg).



$n = 1$  (Asp),  $n = 2$  (Glu)

Фиг.6. Предполагаеми странични реакции на циклизация с образуване на вътрешномолекулен анхидрид, при синтеза на метилови естери на аспартовата (L-Asp) и глутамовата (L-Glu) киселини.

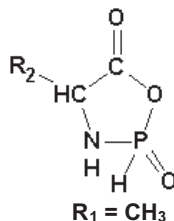


Фиг. 7. Някои от възможните нежелани странични реакции при рибозимомиметичния синтез на метилов естер на аминокиселината тирозин (L-Tyr).

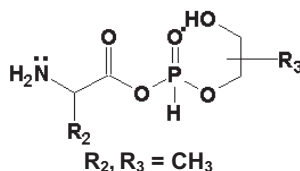
Както беше споменато по-горе, за потвърждаване на предполагаемия основен път на протичане на целевата реакция, някои от основните междинни съединения трябваше да бъдат идентифицирани в хода на реакцията, с цел тяхното доказване, а оттам и потвърждаване на механизма на реакцията и като логично следствие – нейният контрол. За тази цел рибозимомиметичният синтез беше осъществен по следния начин с някои модификации, направени от автора [5-8]:

**Опитна постановка:** Чистата природна алфа-аминокиселина, в случая аланин (0,01 мол, 1екв.) и  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (0,01 мол, 1екв.) се разтварят в смес от  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{CH}_3\text{CN}$ , DMSO или диоксан. Реакционната смес се изстудява на ледено-солева баня (от  $-15^\circ\text{C}$  до около  $-20^\circ\text{C}$ ), 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  $-15^\circ\text{C}$  -  $-20^\circ\text{C}$  за около 30 мин. След това температурата на реакционната смес се вдига бавно до стайна, като след това сместа се нагрява при  $40^\circ\text{C}$  –  $60^\circ\text{C}$  за около 50-60 мин. до 3-4 часа.

В хода на реакцията бяха взимани аликовти през определени периоди от време, като през времето на взимането на съответните аликовти, реакционната смес се изпарява до сухо чрез отдестилиране на диоксана, диметилсулфооксида или ацетонитрила. Взетите аликовти (реакционните смеси) са анализирани с помощта на  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопия.



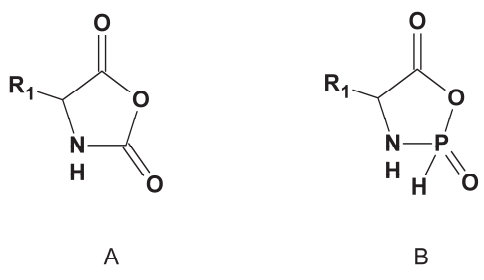
1) 4-алкил-2,5-диоксо-1,3-оксаза-2-Н-2-фосфолан (циклически фосфонамид N-карбоксианхидрид: PANCA (HPANCA):  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta=10.274$  (d,  $J_{\text{H,P}}=319.04$  Hz, 1H, phosphoryl), 9.371 (d,  $J_{\text{H,P}}=2$  Hz, 1H, phosphoryl), 2.345 (m, 1H, 4-CH), 1.442 (d,  $J_{\text{CH}_3,4\text{-CH}}=6.7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta=172.44$  (5-CO), 62.63 (4-CH), 17.63( $\text{CH}_3$ ).



2) Аланил-2-хидроксипропил-Н-фосфонат:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta=7.054$  (t,  $J_{\text{H,P}}=359.8$  Hz, 1H, phosphoryl), 6.153 (t,  $J_{\text{H,P}}=10.5$  Hz, 1H, phosphoryl), 4.093 (dd,  $J_{\alpha\text{-CH}_1,\beta\text{-CH}}=11.34$  Hz,  $J_{\alpha\text{-CH}_2,\beta\text{-CH}}=6.6$  Hz, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3.975 (m, 1H, 2-CH, Ala), 3.912 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}$ ), 3.679 (s, broad, 3H, 2- $\text{NH}_2$ ,  $\beta\text{-OH}$ ), 1.345 (d,  $J_{\text{CH}_3,2\text{-CH}}=7.09$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ala); 1.228 (d,  $J_{1\text{CH}_3,\beta\text{-CH}}=13.1$  Hz,  $J_{2\text{CH}_3,\beta\text{-CH}}=6$  Hz, 3H,  $\beta\text{-CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta=170.05$  (CO), 71.93 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), 68.73 ( $\beta\text{-CH}$ ), 47.85 (2-CH, Ala), 20.63 ( $\beta\text{-CH}_3$ ), 20.07( $\text{CH}_3$ , Ala).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на анализираниите аликвиоти (реакционни смеси) от реакцията за рибозимомиметичен синтез, с помощта на  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопия е установено, че в хода на реакцията се образува първо 2-хидроксифосфонил аденилат, а след това цикличният фосфонамид N-карбоксианхидрид: PANCA (HPANCA). Това доказателство позволява да се потвърди предполагаемият реакционен път и механизма на протичането на реакцията, което дава възможност за оптимизиране на условията с цел – контрол на целевата реакция, повишаване на добивите и чистотата на крайните продукти и свеждане до минимум на нежеланите странични реакции.



### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Videva, V.S., Bairyamov, S.G., Devedjiev, I.T. Bulg. Chem. Commun. 2007, 39, 276.
- [2] Devedjiev, I.T., Bairyamov, S.G., Videva, V.S. Heteroatom Chemistry. 2008, 19, 252.
- [3] Ваурамов, S.G. Научни трудове на Русенски университет - 2010, том 49, серия 9.1, 41 – 48. Русе, 2010 г.
- [4] Ваурамов, S.G., Ваурамов, N.G., Danalev, D. L. & Vassilev, N. G. Unpublished results.
- [5] Ваурамов, S.G., Научни трудове на Русенски университет - 2011, том 50, серия 9.1, 19 – 28. Русе, 2011 г.
- [6] Ваурамов, S.G., Научни трудове на Русенски университет - 2011, том 50, серия 9.1, 39 – 45. Русе, 2011 г.
- [7] Ваурамов, S.G. Научни трудове на Русенски университет - 2012, том 51, серия 9.1, 164 – 168. Русе, 2012 г.
- [8] Ваурамов, S.G., Научни трудове на Русенски университет - 2012, том 51, серия 9.1, 220 – 224. Русе, 2012 г.

### За контакти:

Гл. ас. д-р Станислав Георгиев Байрямов, Катедра “Ремонт, надеждност, механизми, машини, логистични и химични технологии” (PHMMЛХТ), Русенски университет “Ангел Кънчев”, тел.: 082-888 228, 082-888 459, e-mail: sbayramov@uni-ruse.bg

**Докладът е рецензиран**