



УДК 547.241.051.027*2*3

© 1992 г. Г. М. Яковлева, С. Г. Розенберг*,
Г. М. Блакбурн**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТИЛЕНДИФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ,
МЕЧЕННЫХ ДЕЙТЕРИЕМ ИЛИ ТРИТИЕМФилиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН. Пушкино
Московской обл.;

* Институт фармакологии РАМН, Москва;

** Отдел химии, Университет г. Шеффилда, Англия

Описан удобный метод введения тритиевой метки в метиленовую группу метилендифосфоновой кислоты, основанный на модифицированной реакции Виттига – Хорнера. Условия реакции отработаны при получении соответствующего дейтеропроизводного как модельного соединения. Анализ ^{31}P -ЯМР-спектра продукта реакции свидетельствовал о наличии трех изотопомеров: исходной метилендифосфоновой кислоты (42%), ее монодейтерированного (42%) и дидейтерированного (16%) производных.

Метилендифосфоновая кислота (MDP), будучи устойчивым фосфонатным аналогом неорганического пирофосфата (PP_i), широко используется в биохимических исследованиях. На основе MDP синтезирована серия фосфонатных производных нуклеотиди-, три- и тетрафосфатов, содержащих α, β - или β, γ -метиленовые группы [1, 2], а также фосфонатный аналог тиаминдифосфата [3].

Установлено, что MDP может имитировать PP_i в различных метаболических процессах. Например, это соединение способно замещать пирофосфат в реакции пирофосфоролиза, катализируемой РНК-полимеразой из *E. coli* [4]. MDP эффективно ингибирует рост амебы *Dictyostelium discoideum*, вероятно, за счет образования *in vivo* негидролизующих метиленовых аналогов АТФ и диаденозинтетрафосфата [5]. Несмотря на устойчивость С–Р-связи к химическому и ферментативному гидролизу, известны некоторые микроорганизмы, способные использовать MDP в качестве единственного источника фосфора для своего роста [6, 7]. Предполагают, что утилизация MDP штаммом *Pseudomonas* PG 2982 сопровождается образованием метана [6].

Для расширения возможностей применения MDP в исследованиях *in vitro* и *in vivo* представляется целесообразным получение ее радиоактивных производных. Нами разработан удобный метод синтеза меченного тритием аналога MDP с удельной радиоактивностью 30 Ки/моль. Мы исходили при этом из описанной в литературе способности металлизированных метилендифосфонатов вступать в различные реакции замещения, например с галоидалкилами, галогенами и молекулярным водородом [8]. Условия введения тритиевой метки сначала были отработаны при получении [^3H]MDP как модельного соединения. Поскольку наши попытки ввести изотопную метку путем взаимодействия раствора литиевой соли тетраэтилового эфира MDP с D₂O в тетрагидрофуране при -40°C из-за щелочного гидролиза эфирных групп привели к образованию водорастворимых продуктов, выделение которых из реакционной смеси было затруднительным,

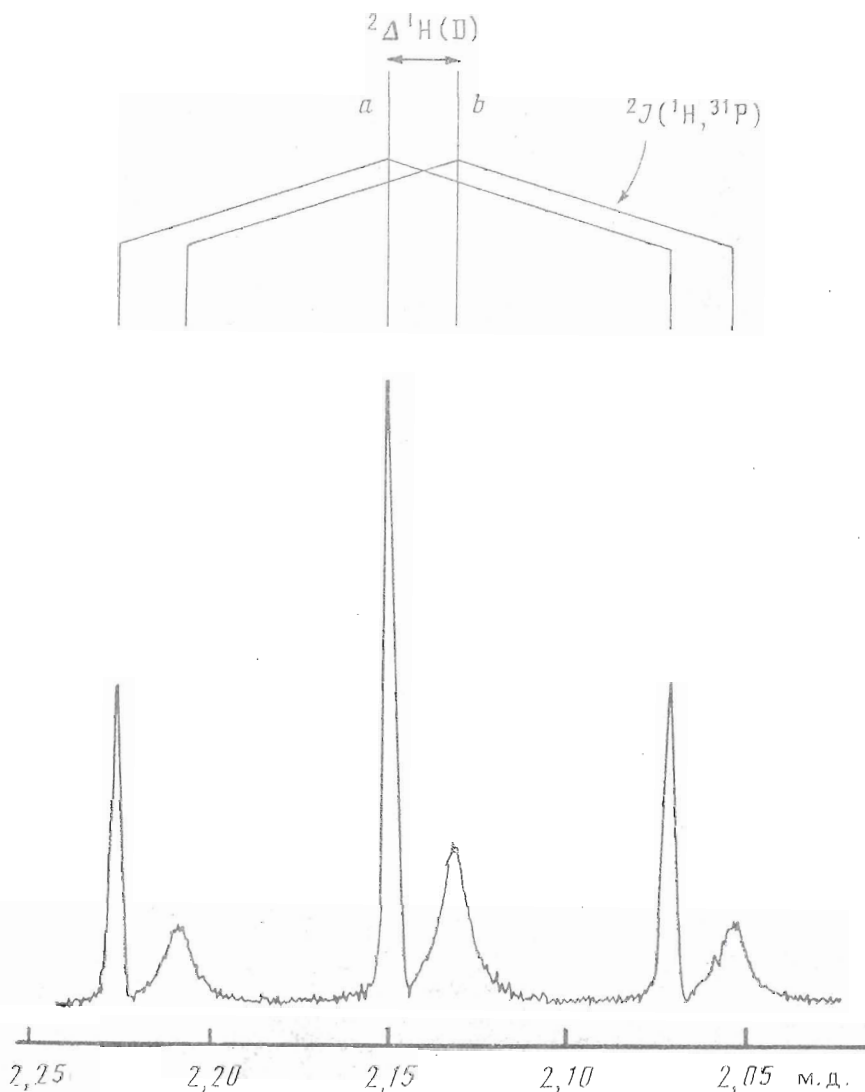
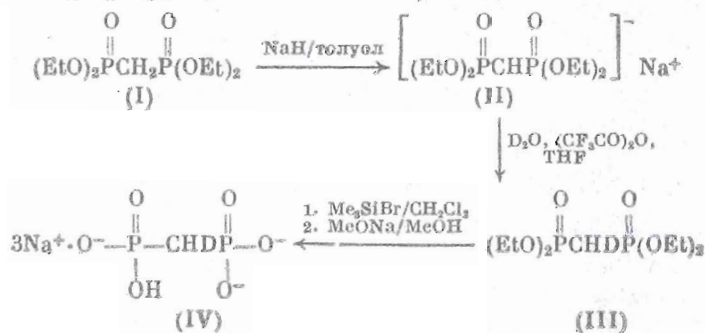


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр (250,13 МГц) смеси метилдифосфоновой кислоты и ее монодейтерированного производного в D_2O

мы остановились на реакции соответствующего натрий-карбаниона с дейтерированной трифторуксусной кислотой (схема).



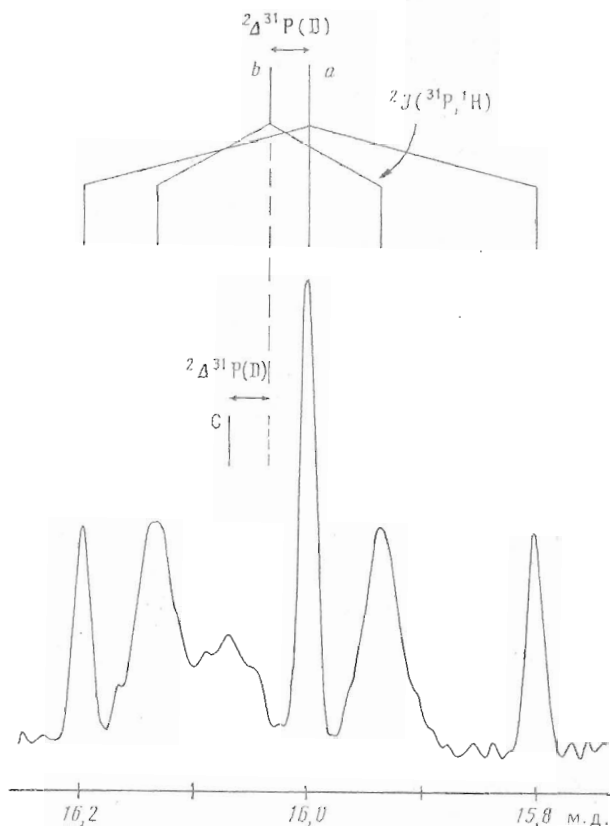


Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектр (101,26 МГц) смеси метилendifосфоновой кислоты, ее моно- и дидейтеропродуктов в D_2O

По стандартной методике [9] образовавшийся тетраэтиловый эфир $[^2H]MDP$ при взаимодействии с триметилбромсиланом превратили в соответствующее силильное производное, из которого щелочным гидролизом получили тринатриевую соль $[^2H]MDP$. Анализ ^{31}P -ЯМР-спектра продукта реакции (рис. 1б) свидетельствует о наличии в нем трех изомеров: триплет обусловлен недеийтерированной MDP (42%), широкий дублет соответствует монодейтерированному производному $[^2H]MDP$ (42%) и неразрешенный мультиплет вызван дидейтерированной $[^2H_2]MDP$ (16%). Аналогичной последовательностью реакций, но с применением тритиевой воды (5 Ки/мл) вместо D_2O из тетраэтилового эфира MDP получили $[^3H]MDP$, специфическая активность которого составляла ~ 30 мКи/ммоль. При сравнении с теоретическим оптимумом удельной радиоактивности (45 мКи/ммоль) это значение свидетельствует о наличии лишь незначительного первичного изотопного эффекта при протонировании карбаниона (II). Судя по результатам радиосканирования соответствующих ТСХ-пластинок, радиоактивная чистота продукта составляла более 98%. Мы не обнаружили заметного изотопного обмена в $[^3H]MDP$ в водном растворе при pH 7–8 по крайней мере в течение 1 недели при $20^\circ C$.

В заключение следует отметить, что при использовании надлежащих образцов тритиевой воды описанный метод позволяет синтезировать изотопные производные MDP в требуемых количествах и с более высокой удельной радиоактивностью.

Экспериментальная часть

В работе использовали тритиевую воду с удельной радиоактивностью 90 Ки/моль (Amersham International), тетраэтиловый эфир MDP (Lancaster Synthesis, Англия), все остальные реактивы были производства фирмы Aldrich. ТСХ проводили на пластинках DC-Alufolien Cellulose F и пластинках Cellulose F 1440, AVICEL (Schleicher and Schuell, Швейцария) в системах: $\text{H}_2\text{O} - \text{NH}_4\text{OH}$ (10%) - $\text{CCl}_3\text{COOH} - \text{MeOH}$ (6:3:1:10) и $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$ (5%) - EDTA (7:1,5:1:0,5). Визуализацию хроматограмм осуществляли либо с помощью аммоний-молибдатного реагента, либо путем сканирования радиоактивных пятен (а Berthold Tracemaster 20 radioscanner, ФРГ). Спектры ЯМР образцов в D_2O на ядрах ^1H , ^3H , ^{13}C и ^{31}P с рабочими частотами 250,13, 266,8, 62,9 и 101,26 МГц соответственно получены на спектрометре ЯМР Bruker AC-250. Химические сдвиги протонов измерены относительно 4,4-диметил-4-силапентансульфоната натрия (DSS) в качестве внутреннего эталона. Химические сдвиги сигналов углерода и фосфора были определены относительно внутренних стандартов CD_3OD (δ 48,24 м. д.) и $(\text{MeO})_3\text{PO}$ (δ 3 м. д.) соответственно.

Тetraэтиловый эфир $[^2\text{H}]$ метилендифосфоновой кислоты (III). К 1,728 г (6 ммоль) тетраэтилового эфира MDP (I) в атмосфере азота при 0° С прибавляли 0,349 г (55%, 8 ммоль) гидроксида натрия в 5 мл толуола. Смесь перемешивали 18 ч при 20° С, охлаждали до -40° С и по каплям прибавляли охлажденный до 0° С раствор дейтеротрифторуксусной кислоты (из 0,882 г (4,2 ммоль) трифторуксусного ангидрида и 0,096 г (4,8 ммоль) D_2O в 2,5 мл тетрагидрофурана). Образовавшуюся смесь перемешивали 1 ч при -40° С и 2 ч при медленном повышении температуры до 20° С. К реакционной смеси прибавляли 25 мл 2 М раствора Na_2SO_4 в 1 М натрий-цитратном буфере (рН 5,0). Водный раствор экстрагировали этилацетатом, экстракт упаривали и получили 1,585 г (92%) эфира (III).

$[^2\text{H}]$ Метилендифосфоновая кислота. К раствору 1,585 г (5,5 ммоль)

Гетероядерные химические сдвиги*, константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) 2* и изотопные химические сдвиги (ИХС) 3* образцов MDP

КССВ, Гц

^1J (^{13}C , ^1H)	^1J (^{13}C , ^3H)	^1J (^{13}C , ^{31}P)	^2J (^3H , ^1H)	^2J (^1H , ^{31}P)	^2J (^3H , ^{31}P)
121,5	18,7	121,5	-16,5	19,8	20,2
δ , м. д.			ИХС, б. д.		
-CH ₂ -		^{31}P	$^1\Delta^{13}\text{C}(\text{D})$	$^2\Delta^1\text{H}(\text{D})$	$^2\Delta^{31}\text{P}(\text{D})$
^1H	^{13}C				
2,15	29,2	16,0	290	16	-35 ^{1*}

* Ошибка измерения $\pm 0,001$ м. д.

2* Ошибка измерения $\pm 0,3$ Гц.

3* 1 б. д. = 0,001 м. д.

1* Минус означает смещение в слабое поле.

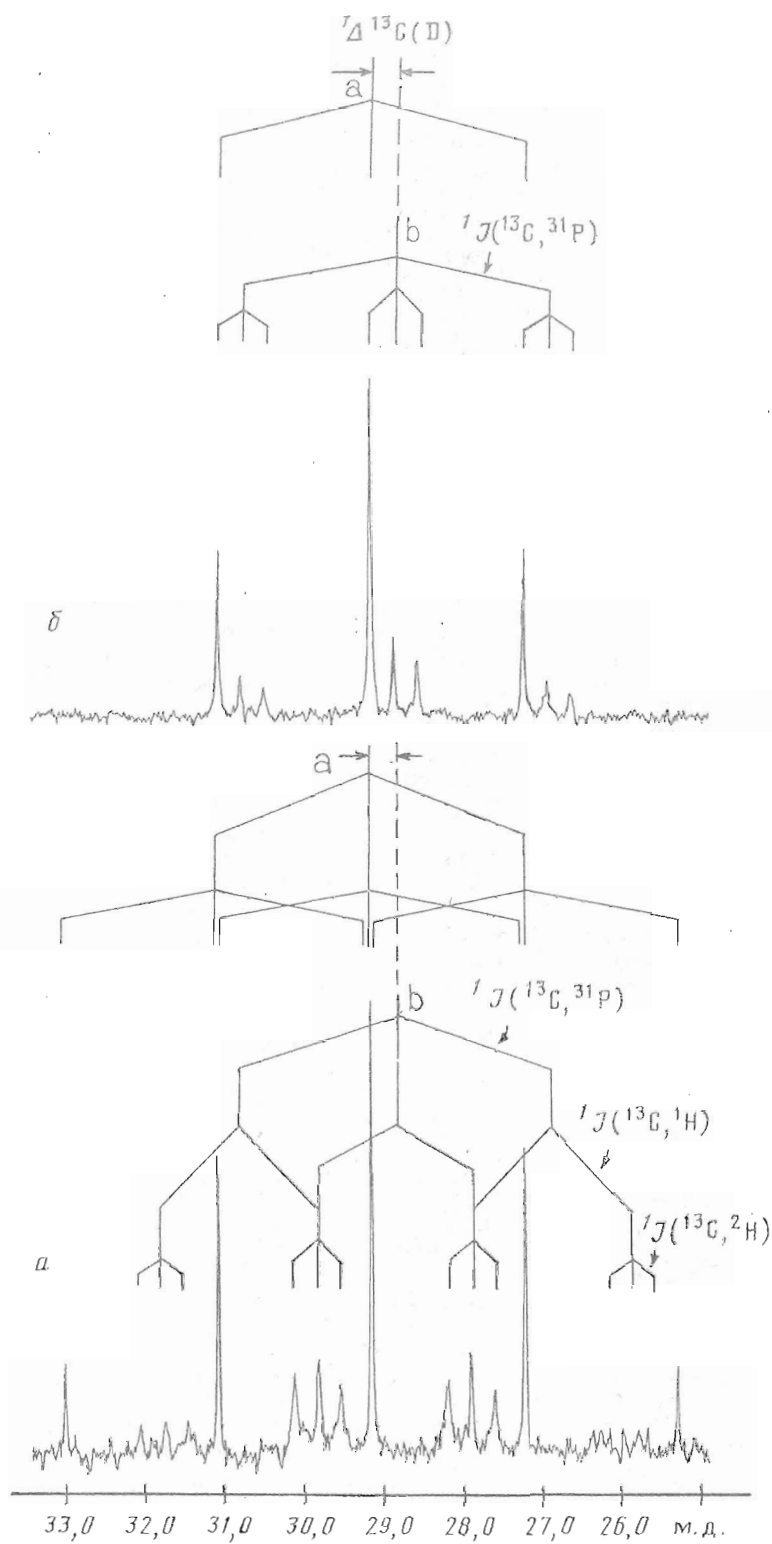


Рис. 3. ^{13}C -ЯМР-спектр (62,9 МГц) смеси метилendisфосфоновой кислоты и ее монодейтерированного производного в D_2O без развязки с протонами (а) и с развязкой с протонами (б)

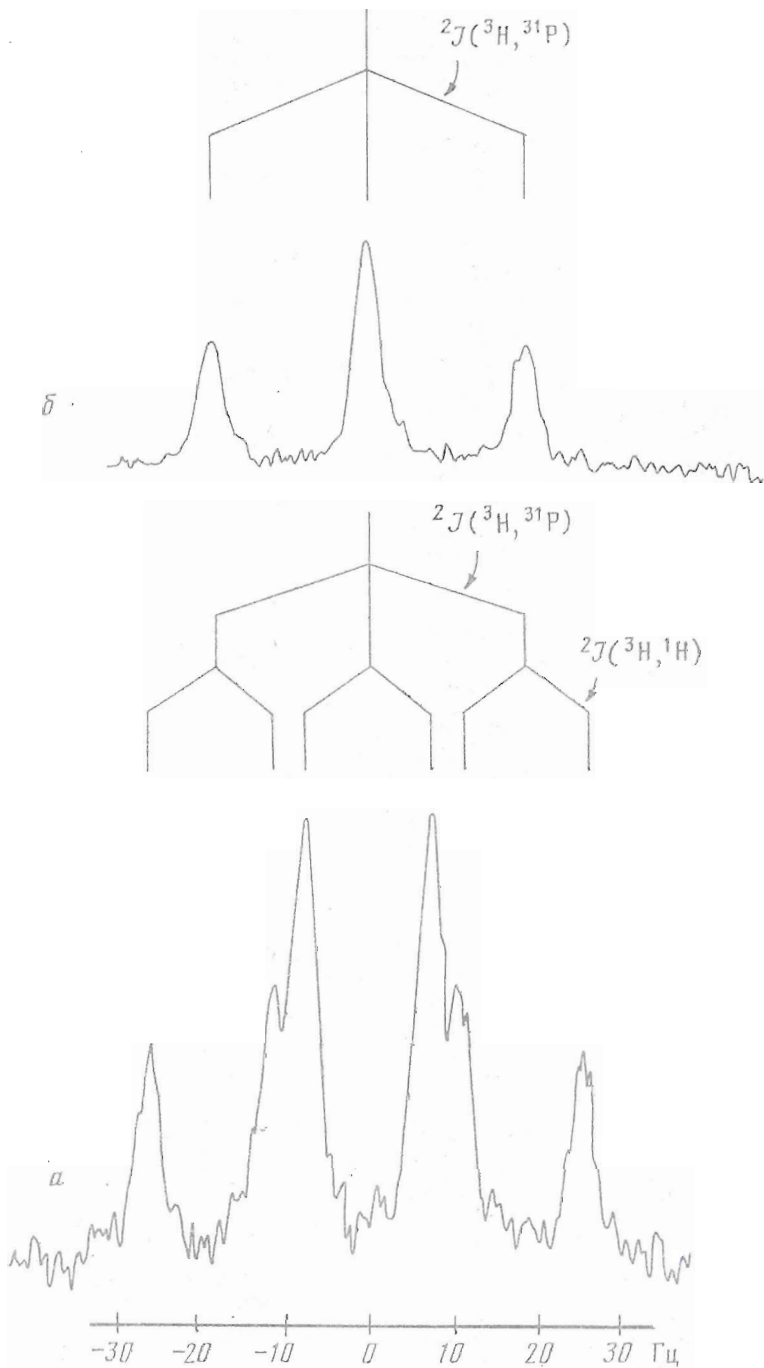


Рис. 4. ^{31}P -ЯМР-спектр (266.8 МГц) мочевиной третием метилцидифосфоновой кислоты в D_2O без развязки с протонами (а) и с развязкой с протонами (б)

эфира (III) в 6 мл дихлорэтана в атмосфере азота при 0° С по каплям прибавляли 4,21 г (27,5 ммоль) триметилбромсилана. Смесь перемешивали 18 ч при 20° С и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл метанола, раствор нейтрализовали метанольным раствором NaOH до pH 7–8 и вновь упаривали. Получили 1,336 г (100%) тринатриевой соли [²H]MDP (IV). МС (FAB), *m/z*: 290 [*M*+1]⁺. Данные спектров ¹H- (рис. 1), ¹³C- (рис. 3) и ³¹P-ЯМР (рис. 2) приведены в таблице.

Аналогичным образом из 1,728 г (6 ммоль) эфира (I) и 0,1 мл ³H₂O (5 Ки/мл) получили 1,390 г тринатриевой соли [³H]MDP, идентичной по хроматографической подвижности аутентичному образцу MDP. Активность продукта составила 197,3 мКи, что соответствует 40% радиохимическому выходу. Данные ³H-ЯМР-спектра (рис. 4) представлены в таблице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheit K.-H. Nucleotide Analogues. N. Y.: John Wiley and Sons, 1980. P. 96–141.
2. Тарусова Н. Б., Осипова Т. И., Пурыгин П. П., Якимова И. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 404–407.
3. Яковлева Г. М., Островский Ю. М. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1279–1282.
4. Розовская Т. А., Челчик А. А., Тарусова Н. Б., Библиашвили Р. Ш., Хомутов Р. М. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. № 6. С. 1205–1223.
5. Klein G., Martin J.-B., Satre M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 6. P. 1897–1901.
6. Kishore G. M., Jacob G. S. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 25. P. 12164–12168.
7. Pipke R., Amrhein N. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 5. P. 1293–1296.
8. Quimby O. T., Curry J. D., Allan Nicholson D., Prentice J. B., Roy C. H. // J. Organometal. Chem. 1968. V. 13. № 1. P. 199–207.
9. McKenna C. E., Higa M. T., Cheung N. H., McKenna M.-C. // Tetrahedron Lett. 1977. № 2. P. 155–158.

Поступила в редакцию
29.IV.1992

G. M. YAKOVLEVA, S. G. ROSENBERG*, G. M. BLACKBURN**

SYNTHESIS OF DEUTERIUM- AND TRITIUM-LABELLED METHYLENEDIPHOSPHONIC ACID

*Branch of Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Pashchino, Moscow Region;*

** Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;*

*** Krebs Institute, Department of Chemistry, University of Sheffield, UK*

A facile method for preparing of tritiated MDP at specific activities comparable to those of available tritiated water and in ample quantity both for further synthetic incorporation into nucleotides and for metabolic studies has been suggested. We chose to pilot this preparation by investigation of the pattern and extent of deuteration of tetraethyl methylenediphosphonate, basing our approach on the known reactions of tetraethyl sodiomethylenediphosphonate with halides, with halogens, and with oxygen.