



УДК 577.152.313*25.042:547.455.62'118.057

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФОСФОНАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮКОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ

© 1995 г. Н. Ш. Падукова[#], С. Афсар*, Г. Б. Ф. Диксон*, М. Я. Карпейский

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117987, Москва, ул. Вавилова, 34

* Факультет биохимии Кембриджского университета, Великобритания

Поступила в редакцию 24.05.94 г.

Синтезированы фосфонатные аналоги глюкоза-6-фосфата и галактоза-6-фосфата: 6-дезоксиглюкоза-6-фосфоно- α,β -D-гликопираноза и 6-дезоксигалактоза-6-фосфоно- α,β -D-галактопираноза. Показано, что полученные фосфонаты являются слабыми ингибиторами 1L-мио-инозит-1-фосфатазы.

Ключевые слова: 6-дезоксиглюкоза-6-фосфоно- α,β -D-гликопираноза; 6-дезоксигалактоза-6-фосфоно- α,β -D-галактопираноза; ингибиторы; 1L-мио-инозит-1-фосфатаза.

Фосфонатные аналоги природных эфиров фосфорной кислоты – уникальные соединения, широко используемые как для изучения механизма действия ферментов, катализирующих различные превращения эфиров фосфорной кислоты, так и для создания на их базе эффективных биологически активных соединений, применяемых в медицине и сельском хозяйстве.

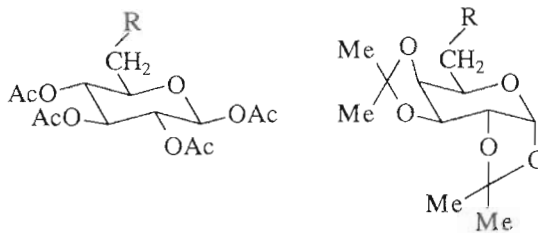
1L-мио-Инозит-1-фосфатаза (КФ 3.1.3.25) катализирует гидролиз двух энантиомерных субстратов. Один из них – 1L-мио-инозит-1-фосфат, называемый также 1D-мио-инозит-3-фосфат (Ins3P) [1], соединение, которое получается из глюкоза-6-фосфата при биосинтезе инозита. Второй субстрат – 1D-мио-инозит-1-фосфат (Ins1P), продукт расщепления инозитсодержащих фосфолипидов [2]. Таким образом, фермент регулирует уровень миоинозита в клетках. А так как действие некоторых терапевтических средств, используемых для лечения заболеваний центральной нервной системы, в особенности маниакальной депрессии, сопровождается повышением уровня мио-инозитфосфата [2], поиск новых ингибиторов мио-инозит-1-фосфатазы представляет большой интерес.

Известно, что многие ферменты, субстратами которых являются эфиры фосфорной кислоты, могут связываться также и с фосфонатными аналогами субстратов, в которых группа $-O-PO_3H_2$ замещена на $-CH_2-PO_3H_2$. Легко видеть, что β -аномеры 6-дезоксиглюкоза-6-фосфонопроизводных глюкозы (VI) и галактозы (XI) могут рассматриваться как структурные аналоги двух субстратов мио-инозит-1-фосфатазы, атом кислорода кольца в которых замещен на $-CH(OH)$ -группу. Фосфонатный аналог мио-инозит-1-фосфата синтезиро-

ван Кулаговским [3], но данные о взаимодействии этого аналога с ферментом не опубликованы.

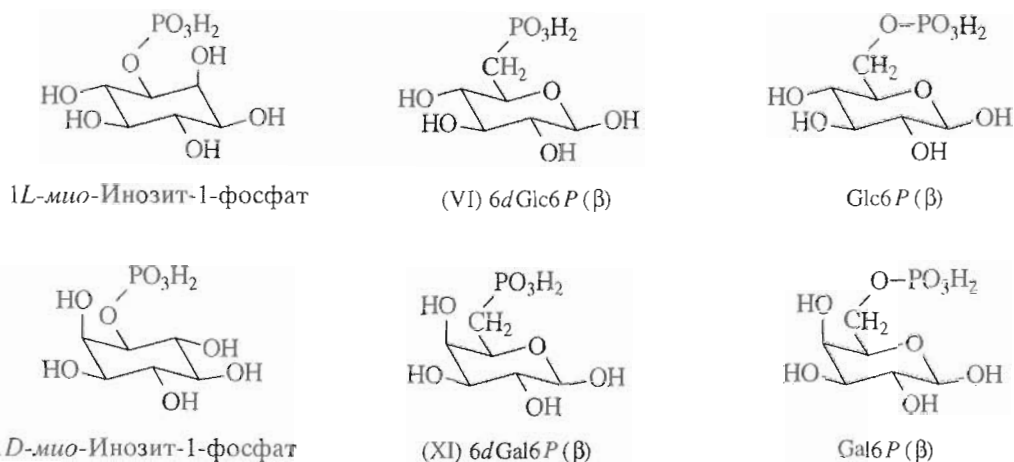
В настоящей работе представлен синтез фосфонатных аналогов глюкоза-6-фосфата и галактоза-6-фосфата: 6-дезоксиглюкоза-6-фосфоно- α,β -D-гликопираноза (VI, 6dGlc6P) и 6-дезоксигалактоза-6-фосфоно- α,β -D-галактопираноза (XI, 6dGal6P).

В литературе известны три подхода для введения фосфонатной группировки в молекулу углевода: ферментативный [4], реакция Виттига [5 - 7] и реакция Арбузова [5, 7 - 11]. Синтез фосфоната (VI) описан ранее [7, 8]. В работе [7] в реакции Арбузова используется 1,2,3,4-тетра-О-бензил-6-бром-6-дезоксиглюкоза, что усложняет снятие защитных группировок и существенно снижает выход фосфоната (VI). В работе [8] авторы выбрали в качестве исходного соединения триацетат левоглюкозана, нагревание которого с PBr_5 в CS_2 с последующим ацелированием приводило к бромиду (III). В настоящей работе



	R		R
(I)	OTr	(VII)	OH
(II)	OH	(VIII)	Br
(III)	Br	(IX)	P(O)(OEt) ₂
(IV)	P(O)(OEt) ₂	(X)	P(O)(OH) ₂
(V)	P(O)(OH) ₂		

[#] Автор для переписки.



предлагается использовать в качестве исходных соединений легко получающиеся производные с единственной свободной OH-группой при C6 ((II) [12] – из глюкозы и (VII) [13] – из галактозы).

Детритилирование полностью защищенной $\beta\text{-D}$ -глюкопиранозы (I) действием $BF_3 \cdot Et_2O$ в метаноле [14] приводило к количественному выходу соединения (II). Бромированием соединений (II) и (VII) смесью $CBr_4\text{-}Ph_3P$ в DMF [15] получали бромиды (III) (выход 60%) и (VIII) (выход 32%). Реакцией Арбузова, кипячением бромидов (III) и (VIII) с $(EtO)_3P$ [9], синтезировали фосфонаты (IV) и (IX) с высокими выходами. В $^1H\text{-ЯМР}$ -спектрах полученных соединений наблюдаются сигналы протонов защитных групп, а также группы $P\text{-}CH_2$ в области 2 м. д. Обработкой полученных диэтилфосфонатов (IV) и (IX) Me_4SiBr в дихлорэтане [16] селективно удаляли этильные группы (выход (V) и (X) 95%). После снятия ацетильных (0.2 М MeONa в метаноле) и изопропилиденных защит (75% AcOH) выделяли с высоким выходом фосфонаты (VI) и (XI). По данным $^1H\text{-ЯМР}$ -спектров этих соединений, соотношение α - и β -аномеров в случае глюкопиранозы 1 : 2.36, в случае галактопиранозы – 1 : 2.

В таблице представлены предварительные результаты по ингибированию $1L\text{-}myo\text{-инозит-1-фосфатазы}$ полученными фосфонатами. Глюкоза-6-фосфат и $6dGlc6P$ (VI) являются конкурентными ингибиторами, для которых значения K_i составляют 23 и 13.5 мМ соответственно (см. таблицу). Глюкоза и галактоза при концентрации 10 мМ не проявляли заметных ингибиторных свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры $^1H\text{-ЯМР}$ регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) и Bruker WM-360 (ФРГ) с рабочей частотой соответственно 100 и 360 МГц при концентрации образцов около 5×10^{-2} М при 35°C. Химические сдвиги протонов (δ) приведены относительно стандарта Me_4Si для растворов в

$CDCl_3$, для растворов в D_2O измерения проводили с внутренним стандартом *tert*-бутиловым спиртом и пересчитывали относительно Me_4Si , принимая химический сдвиг *tert*-бутилового спирта относительно Me_4Si равным 1.27 м. д. Величины КССВ (J) измеряли в герцах. Температуры плавления определены на приборе ТП (СССР) и не исправлены. Препаративную хроматографию проводили на силикагеле L40-100 (ЧСФР), ТСХ – на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧСФР). Системы для ТСХ: $CHCl_3$ (А), $iPrOH\text{-}NH_4OH\text{-}H_2O$ (7 : 1 : 2) (Б). Кристаллические соединения дают удовлетворительный элементный анализ. Выделение и очистку человеческой рекомбинантной $1L\text{-}myo\text{-инозит-1-фосфатазы}$ проводили согласно работе [17]. Активность фермента определяли регистрацией [^{14}C]инозита, получающегося из $1L\text{-}[U\text{-}^{14}C]Ins1P$ (12.5 нКи на опыт) [18]. Суммарную концентрацию субстрата варьировали от 0.05 до 0.5 мМ. Влияние ингибиторов на активность фермента определяли при конечной концентрации ингибитора 10 мМ.

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил- $\beta\text{-D}$ -глюкопираноза (II). К раствору 1.2 г (2 ммоль) соединения (I) [10] в

Ингибирование $1L\text{-}myo\text{-инозит-1-фосфатазы}$ аналогами субстратов*

Соединение	K_i^{**} , мМ
$6dGlc6P$ (VI)	13.5
$Glc6P$	23.9
Glc	>25.0
$6dGal6P$ (XI)	***
$Gal6P$	***
Gal	>25.0

* Константа Михаэлиса, K_m 0.25 мМ.

** [I] 10 мМ.

*** Согласно предварительным результатам, эти соединения проявляют лучшие ингибиторные свойства, чем соответствующие производные глюкозы.

75 мл CH_2Cl_2 добавляли 0.8 мл метанола и 0.25 мл $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Желтый раствор промывали холодной водой (3 × 20 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали, остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (100 г) в хлороформе, получали продукт с количественным выходом – масло, которое кристаллизуется после обработки эфиром, R_f 0.23 (А), т. пл. 128°C (лит. 128 - 129°C [12]). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3): 5.72д (1H, $J_{1,2}$ 8.2; H1); 5.31дд (1H, $J_{3,2}$ 9.5; $J_{3,4}$ 9.5; H3); 5.12дд (1H, H2); 5.08дд (1H, $J_{4,5}$ 9.5; H4); 3.77 - 3.58м (3H, H5, H6); 2.3дд (1H, $J_{\text{OH}, 6a}$ 5.8; $J_{\text{OH}, 6b}$ 8.2, 6-OH, обменивается при добавлении D_2O); 2.11с, 2.08с, 2.04с, 2.03с (4 × 3H, 4Ac).

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-6-бром-6-дезоксид-β-D-глюкопираноза (III). 3.1 г (9 ммоль) соединения (II) высушивали в эксикаторе над P_2O_5 , растворяли в 40 мл DMF, к раствору добавляли 2.4 г (9 ммоль) Ph_3P и 4.3 г (12.9 ммоль) CBr_4 и оставляли в темноте при комнатной температуре на 48 ч. К реакционной смеси добавляли 9.3 мл метанола, упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (200 г), продукт элюировали хлороформом, получали 1.8 г (60%), R_f 0.79 (А). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3): 5.68д (1H, $J_{1,2}$ 8.2; H1); 5.30 - 4.90м (3H, H2, H3, H4); 4.84м (1H, H5); 3.54 - 3.21м (2H, H6); 2.08с, 2.02с, 1.98с, 1.96с (4 × 3H, 4Ac).

1,2,3,4-Ди-О-изопропилиден-6-бром-6-дезоксид-α-D-галактопираноза (VIII) [19, 20] была получена аналогично из 2.5 г (9.6 ммоль) соединения (VII). Выход 1 г (32.3%); R_f 0.8 (А). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3): 5.46д (1H, $J_{1,2}$ 5; H1); 4.57дд (1H, $J_{3,2}$ 7.5; $J_{3,4}$ 2.5; H3); 4.35 - 4.21м (2H, H2, H4); 3.93дт ($J_{5,4}$ 2; $J_{5,6a}$ = $J_{5,6b}$ 7.0; H5); 3.55 - 3.23м (H2, H6); 1.52с, 1.42с, 1.33с, 1.30с (4 × 3H, 4Me).

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-6-дезоксид-6-(диэтилфосфоно)-β-D-глюкопираноза (IV). Раствор 2 г (4.9 ммоль) бромиды (III) в 16 мл $(\text{EtO})_3\text{P}$ кипятили с воздушным холодильником и с защитой от влаги воздуха 12 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в хлороформе и хроматографировали на колонке с SiO_2 (120 г). Продукт элюировали хлороформом. Получали 2 г (71%) продукта (IV), R_f 0.2 (А), 0.7 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3): 5.75д (1H, $J_{1,2}$ 8.2, H1); 5.21т (1H, $J_{3,2}$ 9.5; $J_{3,4}$ 9.5; H3); 5.11д (1H, H2); 4.91дд (1H, $J_{4,5}$ 9.5; H4); 4.07м (5H, H5, OCH_2CH_3); 2.09с, 2.05с, 2.03с, 2.00с (4 × 3H, 4Ac); 2.03м (2H, H6); 1.29т (6H, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2}$ 7; OCH_2CH_3).

1,2,3,4-Ди-О-изопропилиден-6-дезоксид-6-(диэтилфосфоно)-α-D-галактопираноза (IX) получена аналогично из 700 мг (2.17 ммоль) бромиды (VIII). Выход 800 мг (97%); R_f 0.14 (А); 0.78 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3): 5.16д (1H, $J_{1,2}$ 5; H1); 4.32дд (1H, $J_{3,2}$ 7.2; $J_{3,4}$ 2; H3); 4.0 - 3.68м (6H, H4,

H5, OCH_2CH_3); 1.8м (2H, H6); 1.2 - 0.9м (18H, Me, OCH_2CH_3).

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-6-дезоксид-6-фосфоно-β-D-глюкопираноза (V). К раствору 1 г (2.15 ммоль) соединения (IV) в 15 мл дихлорэтана добавляли 3.2 мл BrSiMe_3 и оставляли при комнатной температуре на 12 ч. Раствор упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 21 мл воды и 9 мл пиридина, через 1 ч водный раствор экстрагировали эфиром (3 × 5 мл), упаривали в вакууме досуха и сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Получали 1 г (95%) пиридиниевой соли (V), R_f 0.56 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (D_2O): 5.95д (1H, $J_{1,2}$ 8.0; H1); 2.22с, 2.20с, 2.18с, 2.16с (4 × 3H, 4Ac); 1.94м (2H, H6).

1,2,3,4-Ди-О-изопропилиден-6-дезоксид-6-фосфоно-α-D-галактопираноза (X) получена аналогично из 900 мг (2.37 ммоль) соединения (IX). Выход пиридиниевой соли (X) 900 мг (94%), R_f 0.5 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (D_2O): 5.47д (1H, $J_{1,2}$ 5.2; H1); 4.70 - 4.06м (4H, H2, H3, H4, H5); 1.9м (2H, H6); 1.50с, 1.40с, 1.32с, 1.30с (4 × 3H, 4Me).

6-Дезоксид-6-фосфоно-D-глюкопираноза (VI). Раствор 100 мг тетраацетата (V) в 8.5 мл 0.2 М раствора MeONa в метаноле выдерживали при комнатной температуре 1.5 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 10 мл H_2O , водный раствор промывали хлороформом (5 × 10 мл), наносили на колонку с дауэксом-50 (H^+) (5 мл), элюировали водой, водный раствор кислоты пропускали через колонку с дауэксом-50 (Na^+), элюировали водой, раствор лиофилизировали. Выход динатриевой соли соединения (VI) количественный, R_f 0.09 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (D_2O): α-аномер: 5.3д (1H, $J_{1,2}$ 3.8; H1); 4.17ддд (1H, $J_{5,4}$ 9.5; $J_{5,6a}$ 5.3; $J_{5,6b}$ 8.0; H5); 3.82дд (1H, $J_{3,2}$ 9.8; $J_{3,4}$ 9.0; H3); 3.65дд (1H, $J_{2,1}$ 3.8; H2); 3.38дд (1H, H4); 2.15ддд (1H, $J_{6a, 5}$ 5.3; $J_{6a, 6b}$ 15.0; $J_{6a, P}$ 17.7; H6a); 1.94ддд (1H, $J_{6b, 5}$ 8.0; $J_{6b, P}$ 16.9; H6b).

β-аномер: 4.77д (1H, $J_{1,2}$ 8.0; H1); 3.75ддд (1H, $J_{5,4}$ 9.5; $J_{5,6a}$ 5.5; $J_{5,6b}$ 7.5; H5); 3.58дд (1H, $J_{3,2}$ 9.5; $J_{3,4}$ 9.0; H3); 3.38дд (1H, $J_{2,1}$ 8.0; H2); 3.38дд (1H, H4); 2.15ддд (1H, $J_{6a, 6b}$ 15.0; $J_{6a, P}$ 17.7; H6a); 1.94ддд (1H, $J_{6b, P}$ 17.1; H6b). α : β = 1 : 2.36.

6-Дезоксид-6-фосфоно-D-галактопираноза (XI). Раствор 250 мг (0.62 ммоль) диацетонида (X) в 3.4 мл 75% AcOH нагревали на водяной бане 6.5 ч. Раствор упаривали в вакууме (температура бани 25°C), упаривали с этанолом (5 × 5 мл). Остаток растворяли в 5 мл H_2O и раствор пропускали через колонку с дауэксом-50 (H^+) (5 мл), элюировали водой, к водному раствору добавляли 1 мл конц. NH_4OH , раствор упаривали досуха, кристаллы динатриевой соли сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Выход 147 мг (85%), R_f 0.04 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (D_2O): α-аномер: 5.32д (1H, $J_{1,2}$ 4.0; H1);

4.43ддд (1H, $J_{5,4}$ 0.8; $J_{5,6a} = J_{5,6b}$ 7.6; H5); 4.10дд (1H, $J_{4,3}$ 3.7; H4); 4.00дд (1H, $J_{3,2}$ 10.5; H3); 3.87дд (1H, H2); 2.01 - 2.10м (2H, $J_{6a,6b}$ 15.2; $J_{6,p}$ 16.5; H6).

β -аномер: 4.70д (1H, $J_{1,2}$ 7.9; H1); 4.06дд (1H, $J_{4,3}$ 3.4; $J_{4,5}$ 0.8; H4); 4.00ддд (1H, $J_{5,6a}$ 5.8; $J_{5,6b}$ 7.3; H5); 3.78дд (1H, $J_{3,2}$ 10.1; H3); 3.56дд (1H, H2); 2.01 - 2.08м (2H, $J_{6a,6b}$ 15.2; $J_{6a,p}$ 17.7; H6). $\alpha : \beta = 1 : 2$.

Авторы выражают благодарность доктору С. Флетчер (Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories) за предоставленные 1L-мио-инозитол-1-фосфатазу и 1DL-Ins1P.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) Numbering of Atoms in *myo*-Inositol. Recommendation 1988. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 180. P. 485 - 486.
2. Hallcher L.M., Sherman W.R. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 22. P. 10896 - 10901.
3. Kulagowski J.J. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 3869 - 3872.
4. Webster D., Jondorf W.R., Dixon H.B.F. // Biochem. J. 1976. V. 155. P. 433 - 441.
5. Engel R. // Chem. Rev. 1977. V. 77. P. 349 - 367.
6. Albrecht H.P., Jones G.H., Moffatt J.G. // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 1. P. 79 - 85.
7. Le Marechal P., Froussios C., Level M., Azerad R. // Carbohydr. Res. 1981. V. 94. P. 1 - 10.
8. Griffin B.S., Burger A. // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. P. 2336 - 2338.
9. Mazur A., Tropp B.E., Engel R. // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 20. P. 3949 - 3956.
10. Cerretti P. // Carbohydr. Res. 1981. V. 94. P. C10 - C13.
11. Mikhailov S.N., Padyukova N.Sh., Karpeisky M.Ya., Kolobushkina L.I., Beigelman L. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1989. V. 54. P. 1055 - 1066.
12. Вистлер П.Л., Вольфром М.Л. Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967. С. 177.
13. Вистлер П.Л., Вольфром М.Л. Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967. С. 167.
14. Dax K., Wolflehner W., Weidman H. // Carbohydr. Res. 1978. V. 65. № 1. P. 132 - 138.
15. Verheyden J.P.H., Moffatt J.G. // J. Org. Chem. 1972. V. 37. № 14. P. 2289 - 2299.
16. Morita T., Okamoto Y., Sakurai H. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1978. V. 51. № 7. P. 2169, 2170.
17. Mc Allister G., Witing P., Hammond E.A., Knowles M.R., Atack J.R., Bailey F.J., Margetter R., Ragan C.I. // Biochem. J. 1992. V. 284. P. 749 - 754.
18. Ragan C.I., Watling K.J., Gee N.S., Aspley S., Jackson R.G., Reid G.G., Baker R., Billington D.C., Barnaby R.J., Leesnon P.D. // Biochem. J. 1988. V. 249. P. 143 - 148.
19. Classon B., Garegg P.J., Samuelsson B. // Can. J. Chem. 1981. V. 59. № 2. P. 339 - 343.
20. Bundle D.R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1979. P. 2751 - 2755.

Synthesis and Properties of Glucose and Galactose Phosphonate Derivatives

N. Sh. Padyukova[#], S. Afsar*, H. B. F. Dixon*, and M. Ya. Karpeiskii

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 34, Moscow, 117987 Russia

* Faculty of Biochemistry, Cambridge University, United Kingdom

Abstract – Phosphonate analogs of glucose-6-phosphate and galactose-6-phosphate, namely, 6-deoxy-6-phosphono- α,β -D-glucopyranose and 6-deoxy-6-phosphono- α,β -D-galactopyranose, were synthesized. They were shown to be weak inhibitors of 1L-*myo*-inositol-1-phosphatase.

Key words: 6-deoxy-6-phosphono- α,β -D-glucopyranose, 6-deoxy-6-phosphono- α,β -D-galactopyranose, 1L-*myo*-inositol-1-phosphatase, inhibitors.

[#] To whom correspondence should be addressed.