



УДК 577.113.3:577.152.111*205'134

РИБОНУКЛЕОЗИД-5'-МОНОФОСФАТЫ С ДИЗАМЕЩЕННЫМ ФОСФАТНЫМ ОСТАТКОМ НЕ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С ИНОЗИНМОНОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА

© 1997 г. А. В. Шипицын[#], Е. А. Широкова

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 04.04.96 г.

Осуществлен синтез ряда 5'-фосфонатов инозина как потенциальных ингибиторов IMP-дегидрогеназы. Ни одно из соединений не проявило активности.

Ключевые слова: IMP-дегидрогеназа; инозин, фосфонаты.

IMP-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.205) является одним из ключевых ферментов в синтезе *de novo* пуриновых нуклеотидов – GTP и dGTP. В процессе ферментативной реакции образуется комплекс фермента с субстратом (IMP) и кофактором (NAD). В результате реакции образуются NADH и монофосфат ксантозина – биологический предшественник GMP.

В обзоре [1], посвященном роли IMP-дегидрогеназы в клетках, указывается на прямое соответствие между скоростью деления клеток и активностью этого фермента. Наибольшая активность отмечается для быстро делящихся клеток (тимуса, костного мозга, селезенки и т.д.), тогда как в мышечных тканях и эритроцитах активность IMP-дегидрогеназы весьма низка [1, 2]. Характерно, что в злокачественных опухолевых клетках активность IMP-дегидрогеназы намного выше, чем в доброкачественных [2]. Поэтому поиск ингибиторов IMP-дегидрогеназы – весьма актуальная задача.

Наиболее известные ингибиторы IMP-дегидрогеназы – это С-нуклеозиды тиазофурина (I) и рибавирин (III) [1]. Действующим метаболитом соединения (I) является тиазофуринаденинднуклеотид – аналог NAD, который взаимодействует с IMP-дегидрогеназой в месте связывания NAD в регуляторном центре фермента с большей, чем у NAD, эффективностью [3]. Таким образом, тиазофурина (I) представляет собой эффективный аллостерический ингибитор IMP-дегидрогеназы. Активность рибавирин (III) объясняют прежде всего действием его монофосфата, являющегося субстратным ингибитором IMP-дегидрогеназы [4]. Ингибиторная активность аллостерических ингибиторов этого фермента селеназофурина (II) [5] и

тиофенфурина (IV) [6] близка к таковой для тиазофурина (I).

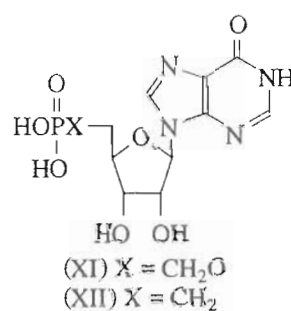
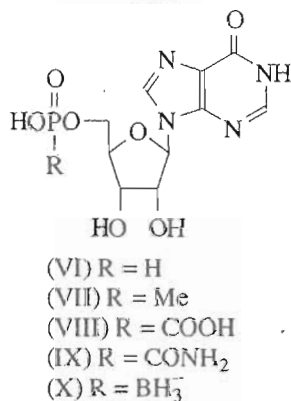
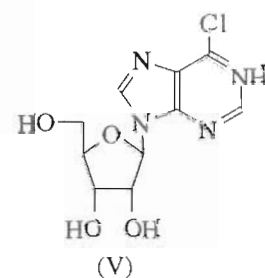
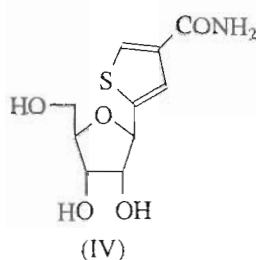
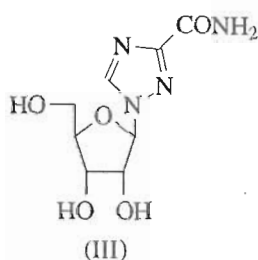
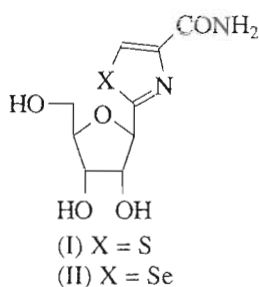
В работе [7] было показано, что 5'-монофосфат 6-хлорпуририбозид (V) является эффективным субстратным ингибитором IMP-дегидрогеназы. Монофосфат 2-хлор-6-оксопуририбозид, связываясь с тем же активным центром фермента, быстро претерпевает окислительное дегалогенирование до ксантозин-5'-монофосфата, который инактивирует фермент. Однако его ингибиторная активность значительно ниже, чем у монофосфата нуклеозида (V).

Производные IMP с модификацией по фосфатному остатку в качестве субстратов или ингибиторов IMP-дегидрогеназы практически не рассматривались в литературе. Известно лишь, что моноалкиловые эфиры IMP не обладают субстратными и ингибиторными свойствами; 5'-тиофосфат инозина проявляет значительно более слабые субстратные свойства, а кинетические параметры связывания 5'-дезоксид-5'-амино- и 5'-дезоксид-5'-тиофосфатов инозина с ферментом сопоставимы с таковыми для IMP [8]. Мы синтезировали производные IMP, модифицированные по фосфатному остатку, для выяснения роли этой модификации в проявлении субстратной и/или ингибиторной активности в отношении IMP-дегидрогеназы. Полученные при этом фосфонаты (VI)–(XII) были исследованы в клеточных и бесклеточных системах как потенциальные ингибиторы IMP-дегидрогеназы.

Фосфонатные аналоги фосфатов часто являются удобными инструментами для изучения ферментов в бесклеточных и клеточных системах [9]. Мы синтезировали однозаряженные фосфит (VI) и метилфосфонат (VII), а также двухзаряженные 5'-дезоксид-5'-(фосфонилметил)инозин (XII), в котором атом кислорода при С5' замещен на СН₂-группу, и метиленфосфонат (XI), который содержит дополнительное метиленовое звено между

Сокращения: DCC – дициклогексилкарбодиимид, Нур – гипоксантин.

[#] Автор для переписки.



5'-P- и 5'-O-атомами. Кроме них были синтезированы карбоксифосфонат (VIII) и соответствующий амид (IX), а также боранфосфат (X). Известно, что борановая (BH₃) группа изоэлектронна кислороду, а заряд боранфосфата близок к заряду фосфатной группы природных нуклеотидов [10].

Исходным веществом для синтеза соединений (VI)–(IX) послужил 2',3'-изопропилиденаденозин (XIII), дезаминирование которого азотистой кислотой при комнатной температуре в водной уксусной кислоте (аналогично [11]) привело к 2',3'-изопропилиденинозину (XIV) (схема). Фосфит (VI), метилфосфонат (VII) и этоксикарбонилфосфонат (XV) были получены действием фосфористой, метилфосфоновой и этоксикарбонилфосфоновой кислот на нуклеозид (XIV) по методу [12]. Гидролиз соединения (XV) водно-спиртовым раствором едкого натра приводит к карбоксифосфонату (VIII), а его аммонолиз в условиях [12] – к амиду (IX). Метиленфосфонат (XI) был получен при взаимодействии производного (XIV) с моноэтиловым эфиром тозилосиметилфосфоновой

кислоты в DMF в описанных условиях [13] с последующей обработкой триметилбромсиланом. Фосфонат (XII) был получен дезаминированием соответствующего аденозинового производного (XVI) аналогично описанному в работе [11].

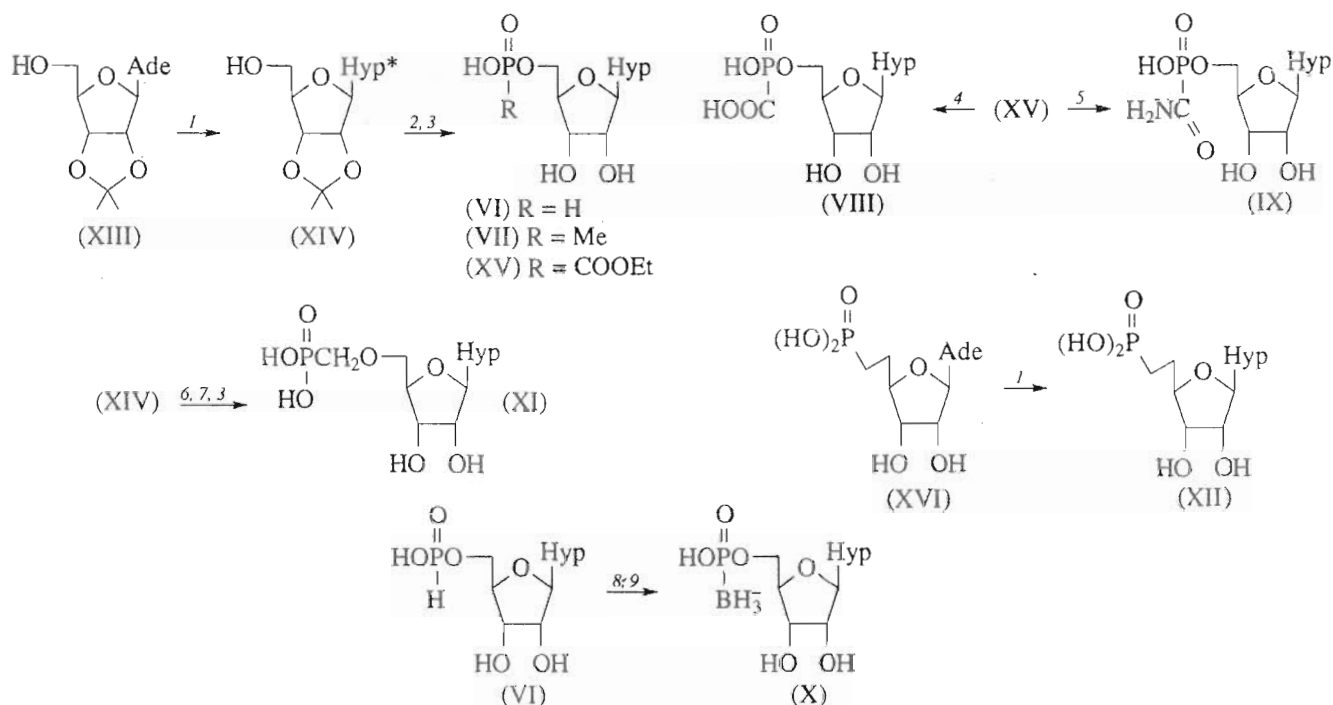
Известен синтез боранфосфатов исходя из фосфимидного производного тимидина [10, 14]. Мы использовали для синтеза производного (X) фосфит (VI), силилированный N,O-бис(триметилсилил)ацетамидом в пиридине, и комплекс борана с диметилсульфидом.

Выходы и характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1, 2.

Соединения были испытаны Ф.Коллартом в лаборатории Э.Губермана (Национальная лаборатория Аргонна, США) в соответствии с методиками, приведенными в работе [15]. Каких бы то ни было заметных субстратных или ингибиторных свойств все эти соединения не проявили. Повидимому, оба анионных центра фосфатной группы участвуют в связывании субстрата с активным

Таблица 1. Выход и характеристики синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	УФ, λ _{max} , нм(ε)	³¹ P-ЯМР, δ, м. д.	Масс-спектр, m/z
(VI)	52	249 (11200)	7.9	333 (MH ⁺)
(VII)	64	249 (10400)	25.8	347 (MH ⁺)
(VIII)	48	249 (11000)	-6.9	377(MH ⁺), 394 (MH ⁺ + NH ₃)
(IX)	60	249 (11500)	-7.0	375 (MH ⁺)
(X)	63	248.5 (10200)	79.7к (J 164 Гц)	346(MH ⁺), 363 (MH ⁺ + NH ₃)
(XI)	56	249 (10300)	16.4	363 (MH ⁺), 380 (MH ⁺ + NH ₃)
(XII)	76	249 (10600)	22.3	347 (MH ⁺), 364 (MH ⁺ + NH ₃)
(XIV)	75	248.5 (11200)		309 (MH ⁺)



Реагенты: 1 – $\text{NaNO}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$, H_2O ; 2 – $\text{RP}(\text{O})(\text{OH})_2$, DCC/Py ; 3 – HCOOH ; 4 – $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$; 5 – $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 6 – $\text{TosOCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, NaN/DMF ; 7 – $\text{Me}_3\text{SiBr}/\text{DMF}$; 8 – $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NCOCH}_3/\text{Py}$; 9 – $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}/\text{Py}$.

* Нур – гипоксантин.

Схема.

центром ИМР-дегидрогеназы, поэтому модификации этой группы приводят к потере нуклеотидом субстратных свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались пиридин, диметилформамид, DCC и раствор комплекса боран-диметилсульфид в диметилсульфиде (Aldrich), 2',3'-изопропилиденаденозин (XIII) (Pharma Waldhof), N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (Fluka), а также DEAE-Toyopearl (Toyosoda) и Lichroprep RP-18 (Merck).

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе Varian XL-100-15 с рабочей частотой 100 МГц (внутренний стандарт – *трет*-бутиловый спирт), ^{31}P -ЯМР-спектры – на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой 250 МГц (с подавлением спин-спинового фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – фосфорная кислота) в D_2O . Масс-спектры в режиме FAB получены на приборе Kratos MS 50TC, образцы смешивались с глицерином. УФ-спектры сняты на приборе Shimadzu UV-1201 в воде при pH 7.0.

2',3'-Изопропилиденинозин (XIV). К раствору 1 г (3.26 ммоль) изопропилиденаденозина (XIII) в

Таблица 2. Данные ^1H -ЯМР-спектров синтезированных соединений, δ , м. д. (J , Гц)

Соединение	H8 + H2	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	Другие сигналы**
(VI)	8.32с; 8.14с	6.08д (5)	*	4.48м	4.35м	4.12м	6.69д (632)
(VII)	8.33с; 8.13с	6.07д (5)	*	4.48м	4.33м	4.08м	1.28д (16)
(VIII)	8.39с; 8.09с	6.04д (5)	*	4.48м	4.35м	4.15м	
(IX)	8.31с; 8.11с	6.05д (5)	4.70м	4.49м	4.36м	4.21м	
(X)	8.52с; 8.11с	6.05д (6)	4.70м	4.41м	4.27м	3.90м	0.21дк (21; 84)
(XI)	8.35с; 8.09с	6.01д (5.5)	4.60м	4.44м	4.32м	3.83м	3.65д (8.5)
(XII)	8.10с; 7.99с	5.92д (5.5)		4.1–4.4м		1.95м	1.6м
(XIV)	8.22с; 7.97с	6.15д (4.5)	5.28м	5.11м	4.64м	4.01м	1.70с; 1.48с

* Сигнал от H2'-протона перекрыт сигналом HOD.

** Сигналы протонов фосфонатных групп соединений (VI)–(XIII) и изопропилиденовой группы соединения (XIV).

10 мл 50% уксусной кислоты в токе аргона при перемешивании прибавили 1 г (14.5 ммоль) нитрита натрия и выдержали 16 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь упарили в вакууме, вязкий остаток растворили в 6 мл воды и упарили до 3 мл. Через 1 ч выпавший осадок отфильтровали, промыли 4 мл холодной воды и высушили в вакууме над оксидом фосфора. Маточный раствор упарили до объема 1.5 мл и оставили при 4°C на 16 ч, дополнительную порцию осадка объединили с основной.

5'-Дезокси-5'-(фосфонилметил)инозин (XII). К раствору 29 мг (0.084 ммоль) 5'-дезокси-5'-(фосфонилметил)аденозина (XVI) в 0.6 мл смеси вода-уксусная кислота (2 : 1) в токе аргона при перемешивании прибавили 30 мг (0.435 ммоль) нитрита натрия и оставили на ночь. Реакционную массу упарили в вакууме, остаток разбавили до 50 мл, раствор подщелочили 5% водным аммиаком до pH 8 и нанесли на колонку (1 × 10 см) с DEAE-Toyopearl. Продукт элюировали в линейном градиенте концентрации бикарбоната аммония в воде (0–0.2 М). Фракцию, вышедшую при концентрации NH₄CO₃ 0.10–0.12 М, упарили, остаток хроматографировали на колонке с Lichroprep RP-18 в воде и лиофилизовали.

Инозин-5'-боранфосфат (X). К суспензии 40 мг (0.12 ммоль) фосфита инозина (VI) в 1 мл пиридина при перемешивании в токе аргона прибавили 0.2 мл N,O-бис(триметилсилил)ацетамида. К полученному раствору через 1 ч прилили 0.2 мл 10 М раствора комплекса боран-диметилсульфид в диметилсульфиде. Реакционную смесь перемешивали в токе аргона 16 ч, затем упарили, остаток разбавили 15 мл 5% водного аммиака (pH 9) и проэкстрагировали толуолом. Водный слой разбавили водой до 300 мл, нанесли на колонку (3 × 10 см) с DEAE-Toyopearl и элюировали линейным градиентом бикарбоната аммония в воде (0–0.2 М). Фракцию, элюировавшуюся при 0.11–0.15 М, упарили, очистили на колонке с Lichroprep RP-18 (в воде) и лиофилизовали.

Авторы благодарят Э.Губермана и Ф.Колларта за проведенные биологические испытания синтезированных соединений, а также С.Н. Михайлова за любезно предоставленный нуклеотид (XVI).

Работа финансировалась программой "Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении" (грант sp351), а также грантами РФФИ № 96-04-48278 и 95-03-08142а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geijsen G.J., Picters R., Veerman A.J.P., Pinedo H.M., Peters G.J. // *Int. J. Purine Pyrimidine Res.* 1991. V. 2. P. 17–26.
2. Jackson R.C., Weber G. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 331–333.
3. Cooney D.A., Jayaram H.M., Gebeyehu G., Betts C.R., Kelley J.A., Marques V.E., Johns D.G. // *Biochem. Pharmacol.* 1982. V. 31. P. 2133–2136.
4. Streeter D.G., Witkovski J.T., Khare G.P., Sidwell R.W., Bauer R.J., Robins R.K., Simon L.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V. 70. P. 1174–1178.
5. Srivastava P.C., Robins R.K. // *J. Med. Chem.* 1983. V. 26. P. 445–448.
6. Franchetti P., Cappellacci L., Grifantini M., Barri A., Nocentini G., Yang H., O'Connor A., Jayaram H.N., Carrell C., Goldstein B.M. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 3829–3837.
7. Antonino L.C., Straub K., Wu J.C. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 1760–1765.
8. Hampton A., Brox L.W., Bayer M. // *Biochemistry.* 1969. V. 8. P. 2303–2310.
9. Krayevsky A.A., Watanabe K.A. // *Nucleosides Nucleotides.* 1993. V. 12. P. 649–670.
10. Sood A., Shaw B.R., Spielfogel B.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 9000–9001.
11. Davoll J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. P. 3174–3176.
12. Jasko M., Shipitsin A., Shirokova E., Krayevsky A., Polsky B., Baron P., MacLow C., Ostrander M., O'Hara B. // *Nucleosides Nucleotides.* 1993. V. 12. P. 879–893.
13. Ясько М.В., Новиков Н.А., Тарусова Н.Б. // *Биоорг. химия.* 1994. Т. 20. С. 50–54.
14. Tomasz J., Shaw B.R., Porter K., Spielfogel B.F., Sood A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992. V. 31. P. 1373–1375.
15. Antonino L.C., Wu J.C. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 1753–1759.

Ribonucleoside 5'-Monophosphates with the Disubstituted Phosphate Residue Do not Interact with Human Inosine Monophosphate Dehydrogenase

A. V. Shipitsyn and E. A. Shirokova

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

Abstract—In a search for potential inhibitors of IMP dehydrogenase, several inosine 5'-phosphonates were synthesized, but none of them exhibited the desired activity.

Key words: IMP dehydrogenase, inosine, phosphonates.