

BIOAKTYWNE *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANOWE POCHODNE NUKLEOZYDÓW

BIOACTIVE *N*-ACYLPHOSPHORAMIDATE NUCLEOSIDE DERIVATIVES

Katarzyna Kulik

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi
Polska Akademia Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-262 Łódź, Poland
e-mail: kpieta@cbmm.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Synteza *N*-acyloamidofosforanów
 2. Synteza analogów aminoacyloadenylnów (aa-AMP)
 3. Synteza Fosmidozyny oraz jej analogów
 - 3.1. Fosmidozyna i Fosmidozyna B
 - 3.2. Trwałość Fosmidozyny
 - 3.3. Analogi Fosmidozyny
 4. Synteza β -asparaginyloadenylnu – potencjalnego inhibitora syntezy asparaginowej
 5. *N*-Acyloamidofosforanowe pochodne nukleozydów
- Piśmiennictwo cytowane
-

Mgr Katarzyna Kulik ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Jej zainteresowania naukowe dotyczą poszukiwania modyfikacji nukleozydowych leków o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym, mających na celu zwiększenie transportu dokomórkowego tych leków.

ABSTRACT

Natural nucleotide antibiotics such as Agrocin 84, Dinoguellin, Microcin C and Phosmidosine have a *N*-acylphosphoramidate linkage at the 5'-hydroxyl of the adenosine derivatives (Fig. 1, 2) [1–3]. They exhibit interesting antifungal, antiemetics and anticancer properties. To synthesize these products, the construction of the *N*-acylphosphoramidate linkages seems to be a key step. Many groups have described the preparation of such a type of analogues but none of those methods was general. Grandas has for the first time reported the synthesis, of *N*-acylphosphoramidate peptide-oligonucleotide hybrids *via* condensation of *N*-phosphitylated carboxyamides with alcohols in the presence of 1*H*-tetrazole [9]. Based on this strategy Sekine synthesized aminoacyl adenylate (aa-AMP) analogues which could be useful in the studies on the recognition mechanism of the aminoacylation of tRNA and other biochemical reactions [10]. Since aa-AMPs are extremely unstable under aqueous conditions more stable analogues were required. Aminoacyl-adenylate analogues having an *N*-acylphosphoramidate linkage (aa-AMPN) could behave as potent, selective asparagine synthetase (AS) inhibitors because of its structural similarity to β -aspartyl-AMP (β AspAMP) which is natural product of AS [17].

Among natural *N*-acylphosphoramidates, Phosmidosine which connects a nucleoside analogue, 8-oxoadenosine, with an L-proline residue is unique because of its significant antitumor activities and property of stopping cell growth at the G1 phase in the cell cycle (Fig. 2) [2, 13]. The main difficulty during the synthesis of this compound is an extreme instability under weak basic conditions which excludes the use of labile protecting group of basic properties [14]. Stability studies have shown that under basic conditions phosphoryl group of Phosmidosine underwent rapid N–N migration (Scheme 9) [16]. Many modifications have been introduced to improve Phosmidosine properties [16]. Analogues such as demethylated species (Phosmidosine B) have proven to be stable under both basic and acid conditions and are also potential candidates for antitumor drugs [14].

Keywords: *N*-acylphosphoramidate function, aminoacyl adenylate analogues, nucleoside analogue, Phosmidosine

Słowa kluczowe: ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe, analogi aminoacyloadenylanów, analogi nukleozydów, Fosmidozyna

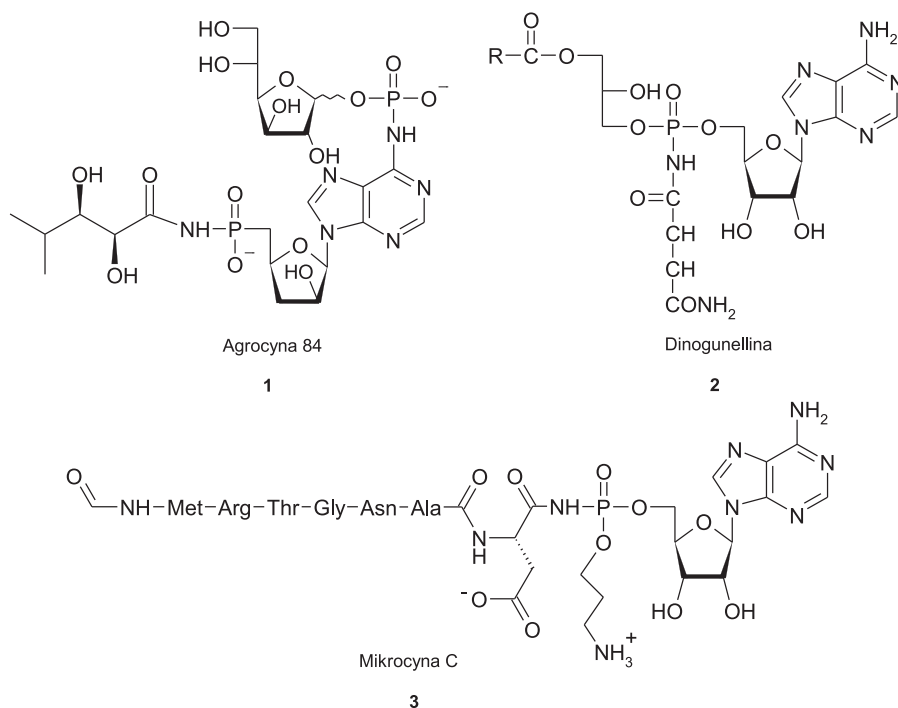
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATP	- adenzyno-5'-trifosforan
AMP	- adenzyno-5'-monofosforan
DIEA	- <i>N,N</i> -diizopropylodetyloamina
DBU	- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undecen-7
Fm	- grupa 9-fluorenometylowa
Boc	- grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Tr	- grupa trytylowa
MMT	- grupa monometoksytrytylowa
Bn	- grupa benzylowa
Bz	- grupa benzoilowa
TBTr	- grupa 4,4',4''-tris(benzoiloksy)trytylowa
TSE	- grupa 2-(trimetylosililo)etylowa
CNE	- grupa 2-cyjanoetylowa
AZT	- 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyna
D4T	- 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidyna

WPROWADZENIE

N-Acyloamidofosforanowe ugrupowanie stanowi bardzo ważny motyw strukturalny różnych bioaktywnych produktów naturalnych i farmaceutyków takich jak Agrocyna 84 [1] i Fosmidozyna [2], które wykazują przeciwgrzybiczne, przeciwwymiotne i przeciwnowotworowe właściwości.

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku opublikowano prace dotyczące naturalnych antybiotyków posiadających w swej strukturze takie ugrupowanie. Należały do nich Agrocyna 84 (**1**, wytwarzana przez bakterie szczepu K-84 *Agrobacterium radiobacter* i wykorzystywana jako środek ochrony roślin) oraz Dinoguenlina (**2**, toksyczny fosfolipid wyizolowany z ikry morskich ryb gatunku *Stichaeus grigorjewi*), zawierające funkcję *N*-acyloamidofosforanową w pozycji 5' analogu adenylozyny (Rys. 1) [1].

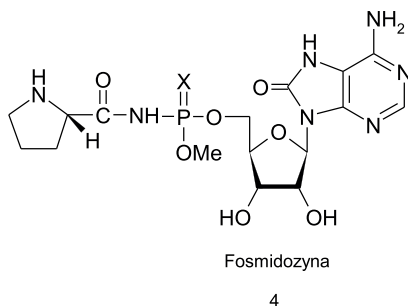


Rysunek 1. Struktury naturalnych antybiotyków zawierających ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe
Figure 1. Structures of natural antibiotics containing an *N*-acylphosphoramidate linkage

Z kolei Mikrocyjna C (**3**, Rys. 1) będąca antybiotykiem syntezowanym przez bakterie należące do rodziny *Escherichia coli* zbudowana jest z heptapeptydu połączonego za pomocą wiązania *N*-acyloamidofosforanowego z modyfikowanym AMP [3]. Peptydowy fragment związku ułatwia transport do wnętrza komórki, w której drogą enzymatycznej hydrolizy następuje jego usunięcie i uwolnienie aktywnego

związku wykazującego silne działanie biologiczne związane z hamowaniem syntezy białek.

Szczególnie atrakcyjnym związkiem okazała się być Fosmidozyna (**4**, Rys. 2) wyizolowana w 1991 roku przez Uramoto i Isono z hodowli *Streptomyces durhameusie*. Ten naturalny antybiotyk łącząc w swej strukturze fragment aminokwasu – proliny z analogiem nukleozydu hamował tworzenie zarodników *Botyitis cinerea*, chorobotwórczych grzybów, owoców i warzyw [2].

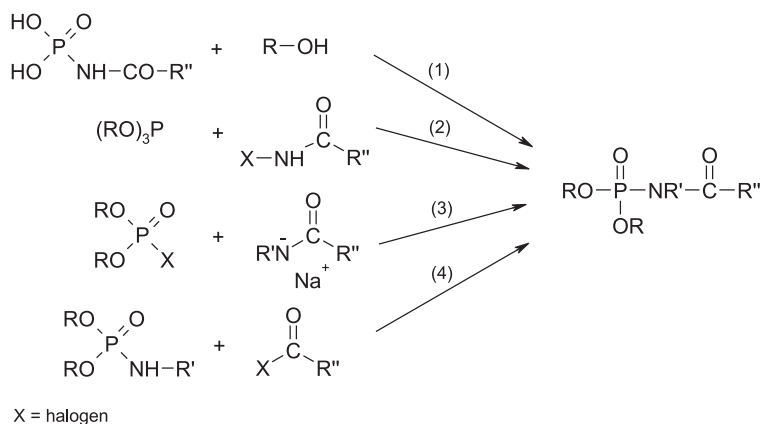


Rysunek 2. Struktura Fosmidozyny
Figure 2. Structure of Phosmidosine

Interesujące właściwości biologiczne *N*-acyloamidofosforanowych pochodnych skłoniły badaczy do poszukiwania dogodnej metody otrzymania tego typu połączeń.

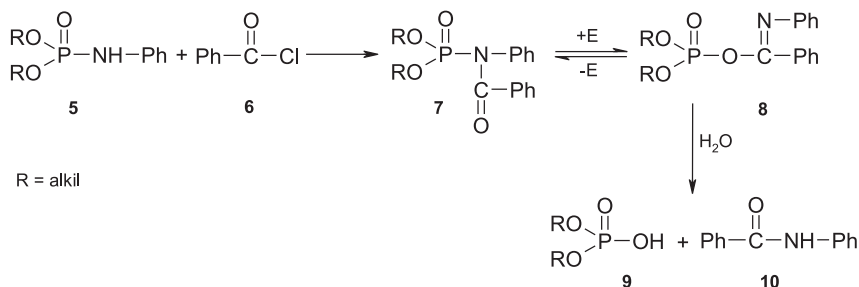
1. SYNTEZA *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANÓW

Należy zauważyć, iż *N*-acylowane amidofosforany już w latach 60. minionego wieku były rozpatrywane jako potencjalne odczynniki fosforylujące. W 1962 roku Zioudrou zaproponował syntezę polegającą na estryfikacji kwasów *N*-acyloamidofosforowych lub chloroacyloamidofosforanów przez odpowiednie alkohole (Schemat 1, droga 1) [4]. Jednakże podstawową jej wadę stanowił fakt, iż substraty do tej reakcji mogły być otrzymane jedynie z aromatycznych karboksamidów lub alifatycznych amidów posiadających podstawniki elektronoakceptorowe przy α atomie węgla.

Schemat 1. Metody otrzymywania *N*-acyloamidofosforanowych pochodnychScheme 1. Methods used for the preparation of *N*-acylphosphoramidate derivatives

Następnie Desmarchelier w reakcji fosforynu trialkilowego z cyklicznymi *N*-halogenoamidami lub halogenoiminami otrzymał odpowiednie *N*-acyloamidofosforany (Schemat 1, droga 2) [5]. Inny sposób otrzymania tego typu połączeń obejmował reakcję anionów pierwszo- i drugorzędowych karboksamidów z chlorofosforanem (Schemat 1, droga 3) [6]. Jednakże żadna z wyżej przedstawionych reakcji nie miała charakteru ogólnego. Najprostszą metodą syntezy *N*-acyloamidofosforanów wydawała się być reakcja bezpośredniego arylowania amidofosforanów. Niestety proces ten okazał się być mało wydajny ze względu na towarzyszące rozerywanie wiązania P–N i tworzenie karboksamidów (Schemat 1, droga 4) [7].

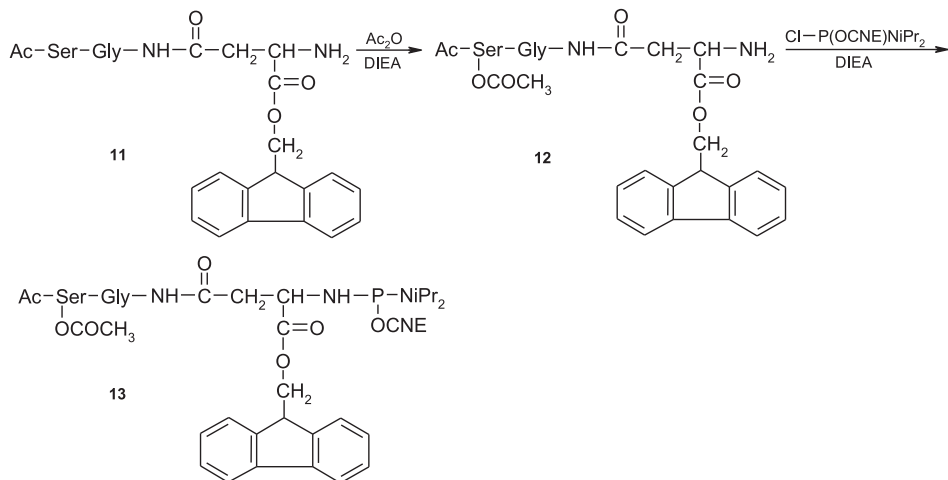
Badania dotyczące bezpośredniego benzoilowania amidodiestrów fosforowych prowadzone w latach 90. ubiegłego wieku w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN pozwoliły wyjaśnić mechanizm tej reakcji [8]. Jej pierwszy etap stanowi *N*-benzoilowanie prowadzące do utworzenia odpowiedniego *N*-benzoilo-*O,O*-dialkiloanilidofosforanu (**7**, Schemat 2), który następnie ulega wolnemu przegrupowaniu do mieszanego bezwodnika *O,O*-dialkilofosforo-*N*-fenyloiminobenzoesowego (**8**) na skutek wewnątrzcząsteczkowego ataku karbonyłowego atomu tlenu na atom fosforu z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P–N. Zaobserwowano, iż przegrupowanie to katalizowane jest przez odczynniki elektrofilowe takie jak chlorek benzoilu. Solwoliza bezwodnika **8** zachodziła z atakiem *N*- oraz *O*-nukleofili na karbonyłowy atom węgla fragmentu benzoilowego w konsekwencji prowadząc do utworzenia kwasu *O,O*-dialkilofosforowego (**9**) oraz odpowiedniego karboksamidu **10**.



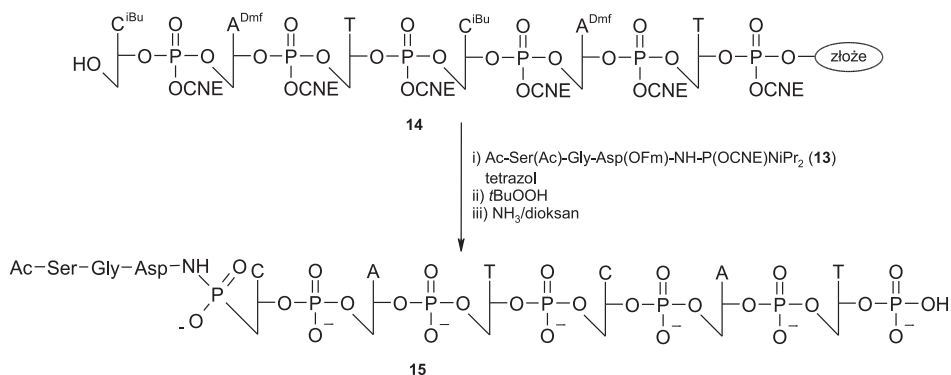
Schemat 2. Katalizowane odczynnikami elektrofilowymi przegrupowanie *N*-benzoilo-*O,O*-dialkiloanilidofosforanów
 Scheme 2. Rearrangement of *N*-benzoyl-*O,O*-dialkyl phosphoranilidates catalysed by electrophilic reagents

Głównie ze względu na dużą ilość reakcji ubocznych żadna z przedstawionych metod syntezy nie mogła znaleźć zastosowania w otrzymywaniu takich związków jak koniugaty peptyd-oligonukleotydy, które były połączone kowalencyjnym wiązaniem *N*-acyloamidofosforanowym. Stąd też zespół Grandas opublikował w 1995 roku metodę opartą na reakcji pierwszorzędowych karboksamidów z P(III) pochodnymi [9].

Pierwszy etap tej syntezy obejmował fosfitylację grupy karboksamidowej asparaginy znajdującej się na C-końcu blokowanego peptydu **12** za pomocą chloroamidofosforynu w obecności zasady (Schemat 3A). Otrzymaną amidofosforynową pochodną **13** kondensowano wobec tetrazolu z 5'-hydroksylową grupą przyłączonego do stałego podłoża oligonukleotydu **14**, a następnie w otrzymanym koniugacie utleniono P(III) atom fosforu za pomocą wodoronadtlenku *tert*-butylowego. W końcowym etapie reakcji stosując roztwór amoniaku w dioksanie usunięto grupy ochronne otrzymując pożądaną koniugat **15** (Schemat 3B).



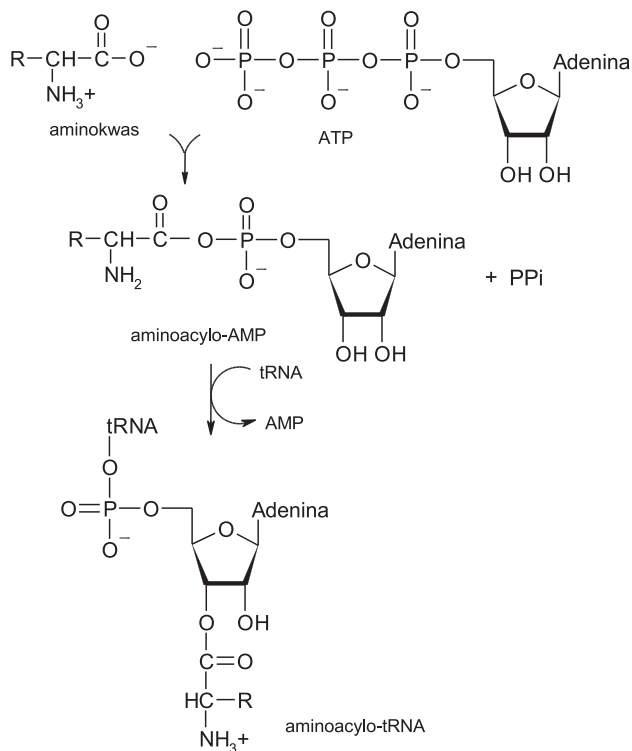
DIEA - *N,N*-diizopropylloetyloamina



Schemat 3. Synteza koniugatu peptyd-oligonukleotydu Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p³²CATCAT

Scheme 3. Synthesis of the peptide-oligonucleotide conjugate Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p³²CATCAT

2. SYNTEZA ANALOGÓW AMINOACYLOADENYLANÓW (aa-AMP)

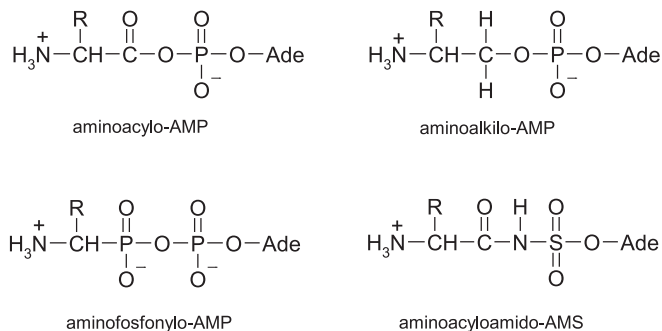


Schemat 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntetazę aminoacylo-tRNA

Scheme 4. Mechanism of the reaction catalyzed by aminoacyl-tRNA synthetase

Analogiczną metodologię syntezy nieopisanych w literaturze chemicznej analogów aminoacyloadenylanów (aa-AMP) zaproponował Sekine. aa-AMP są ważnymi związkami pośrednimi w reakcjach z udziałem syntetaz aminoacylo-tRNA (aaRS), katalizujących dwuetapową reakcję przeniesienia aminokwasu na tRNA. W pierwszym etapie zachodzi aktywacja aminokwasu poprzez przyłączenie pochodzącego z cząsteczki ATP fragmentu AMP (Schemat 4). Z utworzonego aa-AMP syntetaza przenosi aminokwas na 3' (lub 2') hydroksylową funkcję rybozy znajdującej się na końcu 3' łańcucha tRNA, prowadząc do utworzenia aminoacylo-tRNA.

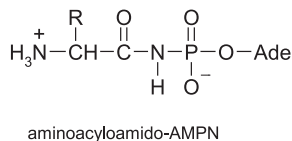
Aminoacyloadenylany będąc pochodnymi bezwodników fosforowokarboksylowych są związkami bardzo niestabilnymi w środowisku wodnym. Mając na uwadze badanie procesów aminoacylowania tRNA poszukuje się trwalszych analogów zawierających takie ugrupowania jak: aminoalkilofosforylowe, aminofosfonylowe czy *N*-acylosulfonamidowe (Rys. 3). Jednakże struktury tych analogów różnią się od aa-AMPs, gdyż nie posiadają podwójnego wiązania C=O, mają dodatkowy ładunek ujemny bądź utraciły ładunek pochodzący z ugrupowania fosforowego.



Rysunek 3. Struktury aminoacyloadenylianów oraz ich analogów

Figure 3. Structures of aminoacyl-adenylates and their analogues

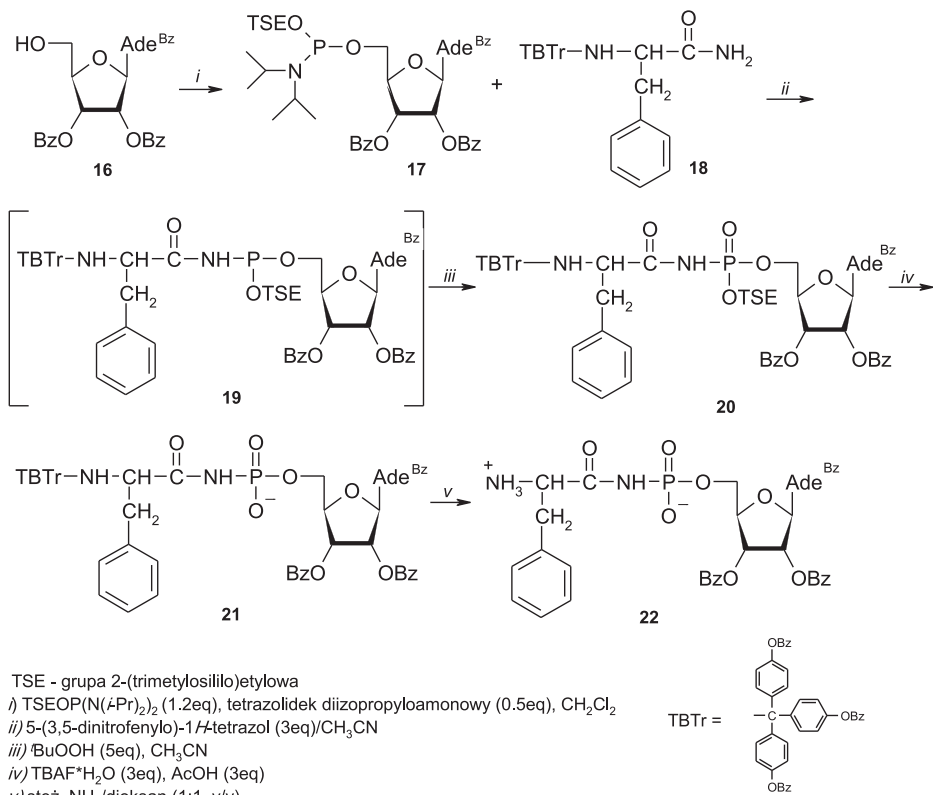
Sekine zaprojektował stabilny w warunkach fizjologicznych analog aa-AMP zawierający ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe, które pozwala, aby związek zachował strukturę jonu zwitterionowego i w którym zachowana jest podobna odległość między atomem fosforu a grupami aminowymi (Rys. 4) [10].



Rysunek 4. Struktura aminoacyloamidoadenylianów zaprojektowanych przez Sekine

Figure 4. Structure of aminoacyl-adenylates designed by Sekine

Odpowiednią 5'-*O*-amidofosforynową pochodną adenozy (17) otrzymywano w reakcji *N*⁶,*O*²,*O*³'-tribenzoiloadenozy (16) z 2-(trimetylosililo)etylo-*N,N,N',N'*-tetraizopropylamidofosforynem wobec tetrazolidku diizopropylamoniowego (Schemat 5) [11]. Jako grupę ochronną funkcji aminowej aminokwasu zastosowano, ułatwiającą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, lipofilową, zasadolabilną grupę 4,4',4''-tris(benzoiloksy)trytylową (TBTr). Kondensację *N*-TBTr pochodnej aminokwasu (18) z 5'-*O*-amidofosforynową pochodną adenozy (17) prowadzono w obecności 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazolu, następnie utleniano amidofosforynowy związek pośredni nadtlakiem *tert*-butylowym. W końcowym etapie reakcji usuwając grupy ochronne otrzymano pożądany produkt 22, który oczyszczano chromatograficznie na kolumnie wypełnionej silikazalem C-18. Omówiona metoda umożliwiła otrzymanie serii aminoacyloamidoadenylianów pochodnych L-fenylalaniny, L-izoleucyny, L-waliny, L-metioniny, L-proliny oraz formy L- i D-tyrozyny.



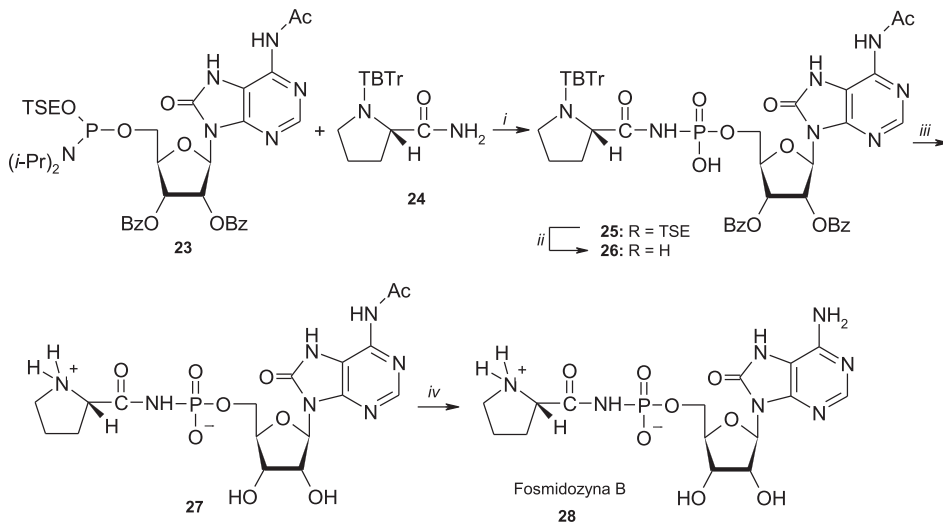
Rysunek 5. Struktura β -aspartylo-AMP oraz jego amidofosforanowego analogu
 Figure 5. Structure of β -aspartyl-AMP and its phosphoramidate analogue

3. SYNTEZA FOSMIDOZYNY ORAZ JEJ ANALOGÓW

Opisana metoda syntezy aminoacyloamidoadenylanów posłużyła zespołowi Sekine do otrzymania Fosmidozyiny oraz jej analogów [12]. Cząsteczka tego nukleotydowego antybiotyku składa się z 8-oksoadenozyny oraz L-proliny połączonych ugrupowaniem *N*-acyloamidofosforanowym. Przesłanką do poszukiwania wydajnej metody otrzymywania analogów Fosmidozyiny były doniesienia literaturowe japońskiego zespołu Osady, który odkrył jej szczególną właściwość związaną ze zdolnością do hamowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego i zatrzymywania jej progresji w fazie G₁ [13].

3.1. FOSMIDOZYNA I FOSMIDOZYNA B

Fosmidozyzna B (**28**) stanowiącą zdemetylowaną pochodną Fosmidozyzny została zsyntezowana w reakcji *N*-acetylo-8-oksoadenozyno-5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej **23** z *N*-blokowanym prolinamidem (**24**) w obecności 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazolu pełniącego funkcję kwasowego katalizatora (Schemat 6) [14]. Jako funkcję ochronną ugrupowania fosforanowego wykorzystano grupę 2-(trimeetylosililo)etylową (TSE), która mogła być selektywnie usuwana za pomocą fluorku tetra-*n*-butyloamoniowego.



i) 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazol/ CH_3CN

ii) tBuOOH

iii) $\text{TBAF} \cdot \text{H}_2\text{O}$, AcOH , THF

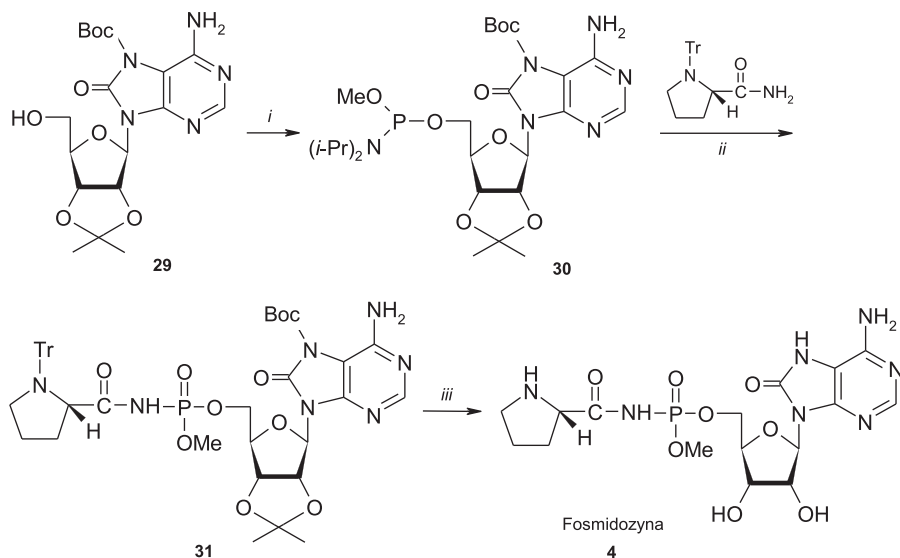
iv) stęż. NH_3 /dioksan (1:1, v/v)

iv) 1M NaOH

Schemat 6. Synteza Fosmidozyzny B

Scheme 6. Synthesis of Fosmidosine B

Synteza Fosmidozyzny drogą selektywnego metylowania grupy *N*-acyloamidofosforanowej Fosmidozyzny B (**28**) za pomocą diazometanu nie powiodła się z powodu niskiej rozpuszczalności tego związku w rozpuszczalnikach organicznych oraz występowania w formie zwitterjonu [15]. Inne podejście polegało na wprowadzeniu grupy metylowej na etapie fosfitylacji pochodnej 8-oksoadenozyny za pomocą bis-(*N,N*-diizopropylamido)fosforynu metylowego. Mimo, iż obserwowano tworzenie się pożądanego produktu kondensacji 5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej nukleozydu z *N*-blokowanym aminokwasem to warunki prowadzenia następczej reakcji usunięcia grupy acetylowej z 6-aminowej funkcji pochodnej adenosyny prowadziły do rozkładu tego związku. O ile Fosmidozyzna B była trwała zarówno w warunkach kwasowych jak i zasadowych to jej metylowana pochodna okazała się być wyjątkowo niestabilna w środowisku zasadowym.



i) $\text{MeOP}(\text{i-Pr})_2\text{N}$, tetrazolid diizopropylamoniowy, CH_2Cl_2

ii) 5-(3,5-dinitrofenylo)-1*H*-tetrazol, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{CN}$ (1:1, v/v); t-BuOOH , CH_3CN ; I_2 , pirydyna- H_2O (9:1, v/v)

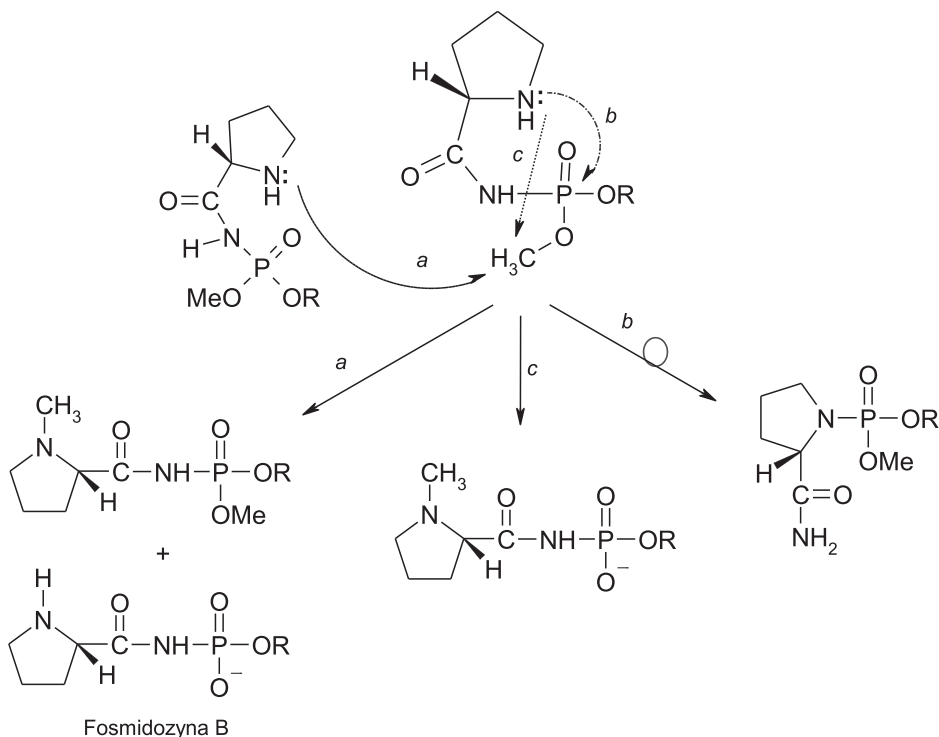
iii) 80% AcOH

Schemat 7. Synteza Fosmidozyny

Scheme 7. Synthesis of Phosmidosine

Ostatecznie wykorzystanie kwasolabilnej grupy *tert*-butoksykarbonylowej (Boc), pozwoliło autorom ominąć problemy związane z niestabilnością Fosmidozyny. Pochodną 8-oksoadenozyny zablokowaną w pozycjach 2'- i 3'- grupą izopropylidenową oraz grupą *tert*-butoksykarbonylową w pozycji N-7 (**29**) poddano reakcji z bis-(*N,N*-diizopropylamido)fosforynem metylowym w obecności tetrazolidku diizopropylamoniowego (Schemat 7). Oddziaływania steryczne i elektrostatyczne wynikające z obecności grupy Boc zablokowały fosfitylację funkcji egzoaminowej nukleozasy. Finalna kondensacja otrzymanej 5'-*O*-amidofosforynowej pochodnej adenozy (**30**) z *N*-*Tr*-prolinamidem, następcza reakcja utlenienia i deprotekcja grup ochronnych w środowisku kwasowym prowadziły do otrzymania Fosmidozyny (**4**) w formie mieszaniny dwóch diastereoizomerów, które zostały rozdzielone techniką HPLC.

Badania aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec linii komórkowych raka żołądka, płuc, krtani oraz odbytu wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową Fosmidozyny B [14]. W przypadku Fosmidozyny właściwości inhibitorowe obu wyizolowanych diastereoizomerów były zbliżone i około 10-krotnie wyższe niż w przypadku Fosmidozyny B.

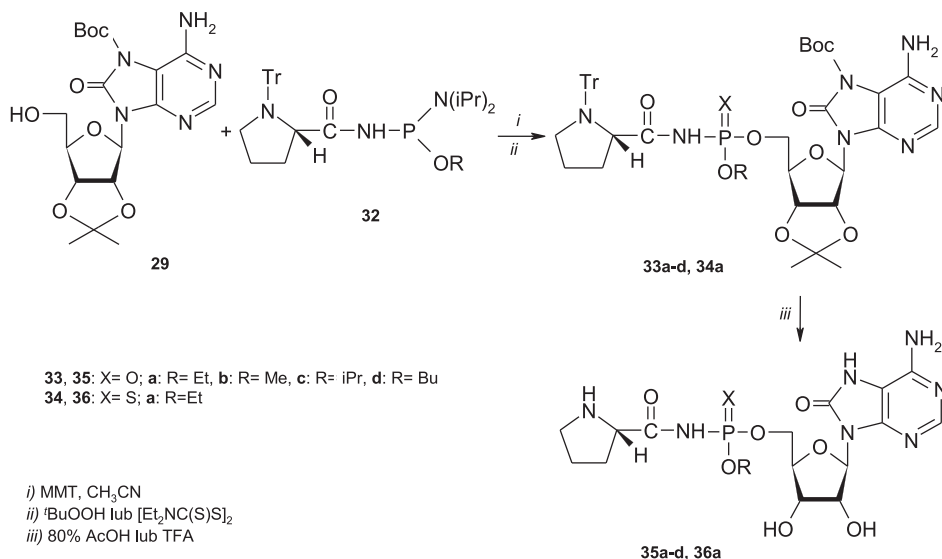


Schemat 9. Mechanizm rozkładu Fosmidozyny w stężonym roztworze

Scheme 9. Mechanism of the decomposition of Phosmidosine in concentrated solution

3.3. ANALOGI FOSMIDOZYNY

Autorzy poszukując stabilniejszych pochodnych Fosmidozyny zsyntezowali serię analogów, w których grupę metylową w ugrupowaniu amidofosforanowym zastąpiono dłuższymi podstawnikami alkilowymi. Związki te otrzymano kondensując *N*-(*N*-trytyloprolilo)amidofosforanową pochodną **32** z blokową kwasolabilnymi grupami ochronnymi pochodną 8-oksoadenozyny (**29**) wobec 5-merkaptot-1-metylo-1*H*-tetrazolu (MMT) (Schemat 10). Spośród otrzymanych pochodnych *O*-etylowa pochodna **35a** była wystarczająco stabilna w roztworze wodnym, natomiast w warunkach zasadowych (0,1 M NaOH) okazała się być 1,5-krotnie stabilniejsza niż Fosmidozyna. W analogiczny sposób przeprowadzono syntezę analogu Fosmidozyny zawierającego ugrupowanie *N*-proliloamidotiofosforanowe (**34a**).



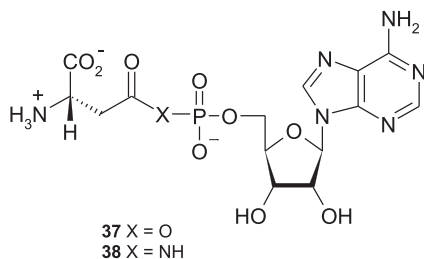
Schemat 10. Synteza analogów Fosmidozyny
 Scheme 10. Synthesis of Phosmidosine analogues

Zespół Sekine otrzymał także serię pochodnych, w których grupę prolinową zastąpiono aminoacylowymi fragmentami aminokwasów jak L- i D- izoleucyna, L-alanina oraz L-metionina.

Badania aktywności przeciwnowotworowej zsyntezowanych analogów Fosmidozyny wykazały, iż zastąpienie fragmentu L-proliny innym L-aminokwasem bądź D-proliną wyraźnie obniża aktywność biologiczną tych związków [16]. W przypadku *N*-prolioloamidotiofosforanowej pochodnej nie obserwowano istotnej zmiany aktywności w stosunku do niemodyfikowanej Fosmidozyny, natomiast w serii pochodnych *O*-alkilowych oba diastereoizomery każdego z analogów Fosmidozyny posiadały podobne właściwości biologiczne.

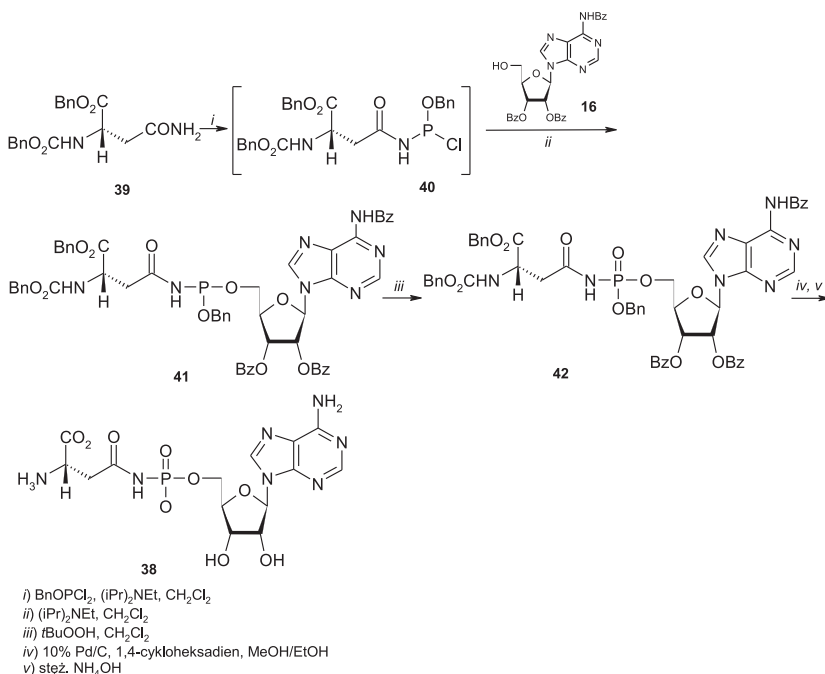
4. SYNTEZA β -ASPARAGINYLOADENYLANU – POTENCJALNEGO INHIBITORA SYNTETAZY ASPARAGINOWEJ

W 2002 roku Richards przedstawił syntezę β -asparaginyloadenyланu jako potencjalnego inhibitora syntetazy asparaginowej [17]. Enzym ten należący do amidotransferaz, pełni funkcję katalizatora syntezy asparaginy z kwasu asparagowego, glutaminy i ATP [18]. Przypuszczano, iż otrzymany β -asparaginyloadenyлан (38, Rys. 5) będąc bliskim analogiem β -aspartylo-AMP (β -AspAMP, 37), naturalnego produktu reakcji katalizowanej przez syntetazę asparaginową, może wykazywać aktywność przeciwnowotworową wobec komórek białaczki.



Rysunek 5. Struktura β -aspartylo-AMP oraz jego amidofosforanowego analogu
 Figure 5. Structure of β -aspartyl-AMP and its phosphoramidate analogue

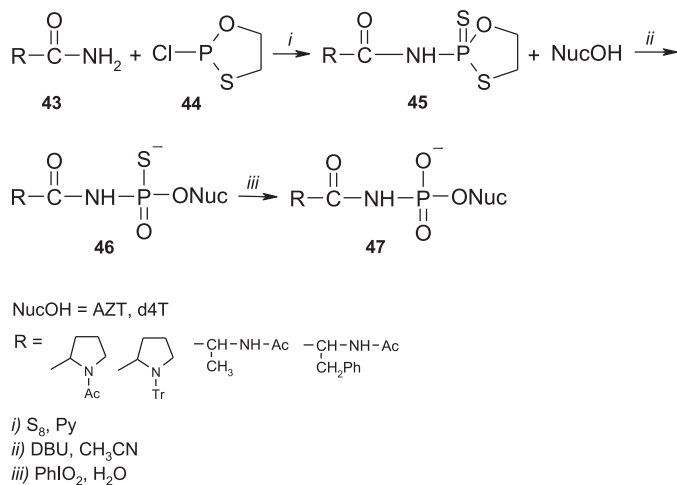
Pierwszy etap syntezy obejmował reakcję blokowanej L-asparaginy (**39**) z dichlorofosforynem *O*-benzylowym prowadzoną w obecności diizopropyletyloaminy (Schemat 11). Otrzymany monochlorofosfinowy związek pośredni **40** kondensowano z N^6, O^2, O^3 -tribenzoiloadenozyną (**16**). Kolejny etap syntezy, jakim było utlenianie otrzymanej pochodnej **41** za pomocą t BuOOH, nie wymagał oczyszczenia substratu i był przeprowadzony bezpośrednio w tym samym naczyniu w obniżonej temperaturze. W końcowym etapie reakcji usunięto grupy ochronne przyłączone do grupy fosforanowej i aminowej otrzymując pożądany *N*-acyloamidofosforan **38** z całkowitą wydajnością 18%.



Schemat 11. Synteza β -asparaginyladenylanu
 Scheme 11. Synthesis of β -asparaginyladenylate

5. *N*-ACYLOAMIDOFOSFORANOWE POCHODNE NUKLEOZYDÓW

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi zaprojektowano serię 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforanowych pochodnych nukleozydów o właściwościach przeciwwirusowych. Przesłanką do otrzymania tego typu potencjalnych pronukleotydydów była stosunkowo niska stabilność wiązania P–N w medium komórkowym mogąca prowadzić do uwolnienia wewnątrz komórki aktywnego monofosforanu nukleozydu. Kluczowymi związkami w tej syntezie były *N*-2-tiono-(1,3,2-oksatiafosfolanowe) pochodne karboksamidów aminokwasów (**45**). W tym celu prolinaamid, alanyloamid oraz fenyloalanyloamid, których grupy aminowe zablokowane były grupą acetylową bądź grupą trytylową poddawano reakcji z 2-chloro-1,3,2-oksatiafosfolanem (**44**) w obecności siarki elementarnej w pirydynie tworząc odpowiednie produkty **45**. Związki **45** reagowały z 5'-hydroksylową grupą wybranych pochodnych nukleozydów tj. AZT oraz d4T wobec silnej zasady DBU, co w rezultacie prowadziło do powstania *N*-acylo-*O*-nukleozydoamidtiofosforanów (**46**). W końcowym etapie syntezy związki **46** utleniało za pomocą jodoksybenzenu do analogów *N*-acylo-*O*-nukleozydoamidofosforanowych (**47**).

Schemat 12. Synteza 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforanowych pochodnych nukleozydówScheme 12. Synthesis of nucleoside 5'-*O*-(*N*-acyl) phosphoramidates

Zsyntezowane 5'-*O*-(*N*-acylo)amidofosforany wykazały aktywność inhibitory w obecnym wirusa HIV-1 oraz HIV-2 porównywalną z niemodyfikowanymi nukleozydami [19].

PODSUMOWANIE

Otrzymanie związków zawierających ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe stanowi nadal duże wyzwanie dla syntetyków. Liczne grupy badawcze koncentrują się na poszukiwaniu wydajniejszych i efektywniejszych metod pozyskiwania tego typu pochodnych. Stosunkowo niska stabilność *N*-acyloamidofosforanów wymusza takie dobranie warunków reakcji, aby zapobiegać ich rozkładowi. Jednocześnie mając na uwadze stabilizowanie cząsteczki oraz poprawę właściwości aktywnych biologicznie *N*-acyloamidofosforanów wprowadza się różnego rodzaju modyfikacje w obrębie ich struktury.

Ugrupowanie *N*-acyloamidofosforanowe poza obecnością w naturalnych antybiotykach, stanowi ważny element strukturalny analogów aminoacyloadenylanów. Dzięki zachowaniu struktury zwitterjonu oraz niemal identycznej odległości między atomem fosforu a grupami aminowymi aminoacyloamidoadenylany należą do potencjalnych inhibitorów enzymów biorących udział w biosyntezie białek.

Wyjątkowa właściwość Fosmidozyiny wynikająca ze zdolności do hamowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego i zatrzymywania jej progresji w fazie G₁ potwierdza, iż *N*-acyloamidofosforanowe analogi Fosmidozyiny należą do obiecujących związków o szerokim spektrum aktywności inhibitorowej wobec komórek nowotworowych.

PODZIĘKOWANIE

Pani dr hab. Janinie Baraniak składam serdeczne podziękowania za bezcenną pomoc i udzielone wskazówki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] (a) W.P. Roberts, M.E. Tate, A. Kerr, *Nature*, 1977, **265**, 379; (b) M.E. Tate, P.J. Murphy, A. Kerr, *Nature*, 1979, **280**, 697; (c) M. Hatano, Y. Hashimoto, *Toxicon*, 1974, **12**, 231.
- [2] (a) M. Uramoto, C.J. Kim, K. Shin-ya, H. Kusakabe, K. Isono, *J. Antibiot.*, 1991, **44**, 375; (b) D.R. Phillips, M. Uramoto, K. Isono, J. A. McCloskey, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 854.
- [3] a) P. Van de Vijver, G.H.M. Vondenhoff, T.S. Kazakov, E. Semenova, K. Kuznedelov, A. Metlitskaya, A. Van Aerschot, K. Severinov, *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 6273, b) K. Severinov, S.K. Nair, *Future Microbiol.*, 2012, **7**, 281.
- [4] C. Zioudrou, *Tetrahedron*, 1962, **18**, 197.
- [5] J.M. Desmarchelier, T.R. Fukuto, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 4218.
- [6] (a) V. Mizrahi, T.A. Modro, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3533, (b) P. K. Chakravarty, W. J. Greenlee, W.H. Parsons, A.A. Patchett, P. Combs, A. Roth, R.D. Busch, T.N. Mellin, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 1886.
- [7] B.C. Challis, J.N. Iley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1987, 1489.
- [8] a) J. Baraniak, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.* 1991, **32**, 137; b) J. Baraniak, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.* 1991, **32**, 4193.

- [9] Robles, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 4856.
- [10] T. Moriguchi, T. Yanagi, T. Wada, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3725.
- [11] T. Moriguchi, T. Yanagi, M. Kunimori, T. Wada, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 8229.
- [12] T. Moriguchi, N. Asai, T. Wada, K. Seio, T. Sasaki, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 5881.
- [13] N. Matsuura, R. Onose, H. Osada, *J. Antibiot.*, 1996, **49**, 361.
- [14] T. Moriguchi, N. Asai, K. Okada, K. Seio, T. Sasaki, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3290.
- [15] A.J. Haines, C.B. Reese, R.A. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1962, 140.
- [16] M. Sekine, K. Okada, K. Seio, H. Kakeya, H. Osada, T. Obata, T. Sasaki, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 314.
- [17] Y. Ding, J. Wang, S.M. Schuster, N.G.J. Richards, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4372.
- [18] N.G.J. Richards, S.M. Schuster, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1998, **72**, 145.
- [19] K. Kulik, E. Radzikowska, R. Kaczmarek, J. Baraniak, W.J. Stec, E. De Clercq, J. Balzarini, Ch. Pan-necouque, *Antivir Chem Chemother.*, 2011, **21**, 143.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 czerwca 2013

