



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

202046
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 473/34

(22) Přihlášeno 15 07 76

(21) (PV 4702-76)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 15 07 75
(25 419 A/75) Itálie

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 08 83

(72)

Autor vynálezu

ZAPPELLI PIERGIORGIO, ROSSODIVITA ANTONIO,
PAPPA ROSARIO, MONTEROTONDO a RE LUCIANO, ŘÍM (Itálie)

(73)

Majitel patentu

SNAMPROGETTI S. p. A., MILÁN (Itálie)

(54) Způsob přípravy funkcionalizovaných derivátů adeninu

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy adeninových derivátů s reaktivními funkcemi a tím získaných produktů. Podrobněji uvedeno se předložený vynález týká způsobu přípravy adeninových derivátů s reaktivními funkcemi majících v poloze 8 postranní řetězec omega-karboxylové kyseliny, při kterém se vychází ze sloučenin, které obsahují adeninové jádro s halogenovým atomem v této poloze. Východí látky pro tento způsob se mohou získat běžnými postupy, halogenováním sloučenin obsahujících adeninový cyklus např. amidu kyseliny nikotinové, dinukleotidu adeninu (NAD^+), fosforečnanu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu (NADP^+), trifosfátu adenosinu (ATP), difosfátu adenosinu (ADP), monofosfátu adenosinu (AMP), adenosinu.

Většina těchto sloučenin má důležitý význam v biochemii a jejich funkcionalizace rozšiřuje jejich aplikační oblast.

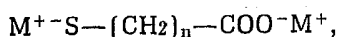
Tak například v případě NAD^+ , přičemž však budiž poznamenáno, že tyto vývody se také dobře hodí pro ostatní členy, jeho funkcionalizované deriváty se mohou užívat po spojení kovalentní vazbou s makromolekulami, které jsou buď ve vodě rozpustné nebo nerozpustné, jako nedifundující koenzymy nebo v afinitní chromatografii. V případě navázání na vodorozpustné

2

makromolekulární látky mohou být vzniklé produkty použity jako nedifundovatelné vodorozpustné makromolekularizované koenzymy. Tyto látky rozšiřují možnosti použití známých enzymatických systémů, ve kterých je enzym fyzicky zabudován v nerozpustných porézních strukturách, jako jsou vlákna, polyakrylamidový gel, mikrokapsle apod., které jsou neprůchodné pro makromolekuly. Důsledkem fyzického zabudování vodorozpustného makromolekularizovaného koenzymu do enzymu nebo polyenzymatického systému je ve skutečnosti to, že jak enzym, tak koenzym zůstávají v těsném kontaktu a je znemožněno rozptýlení koenzymu ven z uzavřené struktury. Tento jev není u přírodního koenzymu možný vzhledem k jeho nízké molekulové hmotnosti. V případě navázání na vodorozpustné makromolekulární sloučeniny lze produktů použít v afinitní chromatografii nebo pro enzymatické reakce v heterogenní fázi, přičemž je možno regenerovat koenzym.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy funkcionalizovaných derivátů adeninu, který spočívá v tom, že sloučenina ze skupiny dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, fosfátu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, adenosinmonofosfátu, cyklického adenosinmonofosfátu, adenosintrifosfátu, adenosinu a

adeninu, jejíž adeninové jádro je v poloze 8 substituováno halogenem, se nechá v prostředí polárního aprotického rozpouštědla při teplotě 20 až 60 °C reagovat se sloučeninou obecného vzorce



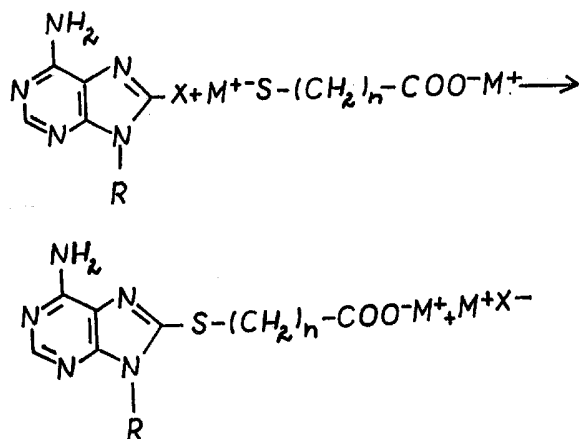
kde

M je ion alkalického kovu a

n je celé číslo 2 až 4.

Jako aprotického polárního rozpouštědla lze použít například hexamethyltriamidu kyseliny fosforečné, dimethylsulfoxidu a dimethylformamidu. Reakce se provádí za bezvodých podmínek a s výhodou při teplotě místnosti.

Při reakci dochází k substituci halogenu v poloze 8 adeninového jádra podle tohoto schématu:



kde

n a M⁺ mají též význam, jak je uvedeno nahoře,

X znamená halogen a

R je neadeninový zbytek sloučeniny.

Sůl takto získaného karboxylového derivátu se potom převede v průběhu zpracování na příslušnou volnou kyselinu.

Způsob je zcela obecný avšak v další části popisu se bude uvádět reakce dvojsodné soli kyseliny 3-merkaptopropionové s deriváty NAD⁺ a NADP⁺, které byly bromovány na uhlíku v poloze 8 adeninového jádra adenosinu, a to za účelem osvětlení způsobů, jichž je zapotřebí pro provádění zmíněného postupu.

Při studiu dalšího popisu bude však vždy jasné, že každý odborník může získat funkcionalizované adeninové deriváty, popsané nahoře, vycházející z jakéhokoli adeninového základního skeletu substituovaného halogenem v poloze 8, prostým přizpůsobením pracovních podmínek povaze výchozí sloučeniny a aniž překročí rozsah tohoto vynálezu.

Příklad 1

Příprava 8-(2-karboxyethylthio)adenosinu

K roztoku 380 mg (1,1 mmol) 8-bromadenosinu v 8 ml bezvodého hexamethyltriamidu kyseliny fosforečné se přidá za míchání při teplotě místnosti a bezvodé atmosféře (dusík) 633 mg (4,2 mmol) dvojsodné soli kyseliny 3-merkaptopropionové (připravené z merkaptokyseliny přidáním stechiometrického množství hydridu sodného při teplotě místnosti v bezvodém tetrahydrofuranu a odstraněním rozpouštědla za sníženého tlaku).

Po 16tihodinovém míchání při teplotě místnosti se směs zfiltruje a filtrát se doplní 15 ml vody a extrahuje několikrát chloroformem, až se zbaví hexamethyltriamidu kyseliny fosforečné.

Vodný roztok se upraví přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové na pH 8,5 a chromatografuje se na DOWEX-1 (HCOO⁻) za eluování gradientem kyseliny mravenčí ve vodě. Frakce s λ_{max} 282 nm se spojí, mrazově suší o poskytnou 327 mg 8-(2-karboxyethylthio)adenosinu.

Při analýze v tenké vrstvě (silikagel s fluorescenčním indikátorem; eluční činidlo isopropanol-voda-32% amoniak v objemovém poměru 7:2:1; vizualizace skvrny UF zdrojem při 254 nm; R_f = 0,56) se produkt jeví jako čistý a také při vysokovoltové elektroforéze (Whatmanův papír 3MM 11 × 57 cm; elektrolyt 0,02 M octan amonný pH 5,0, potenciál 5000 V během 40 minut, vizualizace skvrny UF zdrojem při 254 nm; pohyb produktu směrem k anodě se shoduje s přítomností karboxylové skupiny, zatímco adenosin migruje směrem ke katodě).

UF spektrum v 0,1 M NaOH má vrcholovou absorpci při 282 nm zatímco 8-bromadenosin ji má při 263 nm.

¹H NMR v NaO²H vykazuje mimo signály vztahující se k adenosinu s vyloučením protonového z polohy 8 ty, které připadají na vrub protonů postranního řetězce: 2,88 (2H, t; CH₂COO) a 3,86 (2H, t; CH₂S).

Také hmotnostní spektrum potvrzuje strukturu přisuzovanou produktu (m/e 239, 221, 192, 167).

Příklad 2

Příprava dinukleotidu nikotinoylamid-8-(2-karboxyethylthio)adenosinu.

K 118 mg (160 mmol) dinukleotidu nikotinoylamid-8-bromadenosinu rozpuštěného v 2 ml bezvodého dimethylsulfoxidu se přidá za míchání při teplotě místnosti pod bezvodou atmosférou (dusík) 98,4 mg (656 mmol) dvojsodné soli kyseliny 3-merkaptopropionové.

propionové (připravené podle příkladu 1). Po 16tihodinovém míchání při teplotě místnosti se směs zfiltruje a k filtrátu se přidá desetinásobek jeho objemu acetonu.

Získaná sraženina oddělená odstředěním a promytá acetonem se suší za sníženého tlaku a rozpustí v 15 ml 0,1 M HCl. Roztok se upraví na pH 7,5 zředěnou sodou a chromatografuje se na DOWEX—1 (HCOO⁻) eluováním gradientem kyseliny mravenčí ve vodě.

Chromatografické frakce s $\lambda_{\max}$ 276,5 se spojí a po mrazovém vysušení dají 90 miligramů dinukleotidu nikotinoylamid-8-(2-karboxyethylthio)-adeninu. Při tenkovrstvé chromatografii na silikagelu s fluorescenčním indikátorem se ukazuje, že produkt je čistý; eluční prostředek: isomáselná kyselina—voda—32% amoniak v objemovém poměru 66:33:1,7; vizualizace skvrny UV zdrojem při 254 nm; Rf 0,31 (a při vysokovoltové elektroforéze s 3MM Whatman papírem 11 × 57 cm; elektrolyt: 0,02 M octan amonný, pH 5,0, potenciál 5000 V během 30 minut; vizualizace skvrny UV zdrojem při 254 nm; pohyblivost směrem k anodě než u NAD⁺ v souhlasu s přítomností karboxylové skupiny).

Ultrafialové spektrum v roztoku pyrofosfátového ústojného roztoku o pH 8,7 má maximum při 276,5 nm, které při enzymatické redukci alkohol—dehydrogenázou z kvasnic přechází na 282 nm za vzniku nového vrcholu při 340 nm, který je charakteristický pro redukované nikotinoylamidové jádro.

¹H NMR v ²HO vykazuje mimo signály vztahující se k NAD²⁺ s vyloučením protonového od uhlíku v poloze 8 adeninového

jádra ty, které připadají na vrub protonů postranního řetězce: delta 2,88 (2H, t; CH₂COO) a 3,86 (2H, t; CH₂S). Také hmotnostní spektrum potvrzuje strukturu příslušnou produktu (m/e 221, 192, 167).

Příklad 3

Příprava fosfátu dinukleotidu nikotinoylamid-8-(2-karboxyethylthio)adeninu.

K 50 miligramům (57,6 mikromol) fosfátu dinukleotidu nikotinoylamid-8-bromadeninu rozpuštěného v 1 ml bezvodého dimethylsulfoxidu se přidá za míchání při teplotě místnosti a pod bezvodou atmosférou (dusík) 36 miligramů (240 mikromol) dvojsodné soli kyseliny 3-merkaptopropionové (připravené jak bylo popsáno v příkladě 1).

Po 16tihodinovém míchání při teplotě místnosti se směs zfiltruje a k filtrátu se přidá 10 objemů acetonu. Získaná sraženina se oddělí odstředěním, promyje acetonem, suší za sníženého tlaku a rozpustí v 10 ml 0,1 M HCl.

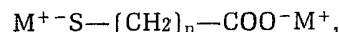
Zředěnou sodou se upraví pH roztoku na 7,5 a chromatografuje se na DOWEX—1 (Cl⁻) eluováním gradientem CaCl₂ ve vodě okyseleného na pH 3 přidavkem HCl. Chromatografické reakce obsahující očekávaný produkt se spojí, zkoncentrují na malý objem a zbaví solí gelovou filtrací na Sephadexu G—10 eluováním produktu vodou.

Charakterizace fosfátu dinukleotidu nikotinoylamid-8-(2-karboxyethylthio)-adeninu se provádí podobně, jak bylo popsáno v příkladu 2 pro příslušný derivát NAD⁺ (pro enzymatickou redukci se použila glukózo-6-fosfátdehydrogenáza).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy funkcionalizovaných derivátů adeninu, vyznačující se tím, že sloučenina ze skupiny dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, fosfátu dinukleotidu nikotinoylamidadeninu, adenosinmonofosfátu, cyklického adenosinmonofosfátu, adenosintrifosfátu, adenosinu a adeninu, jejíž adeninové jádro je v poloze 8 substituováno halogenem, se nechá v prostředí polárního aprotického rozpouštědla při teplotě 20 až

60 °C reagovat se sloučeninou obecného vzorce



kde

M je ion alkalického kovu a
n je celé číslo 2 až 4.