

Synteza i badanie właściwości mononukleotydowych analogów końca 5' mRNA zawierających podstawniki benzytowe przyłączone poprzez ugrupowanie 1,2,3-triazolowe do zasady azotowej



Magistrant: **Radosław Wójcik**

Promotor: **prof. dr hab. Jacek Jemielity**

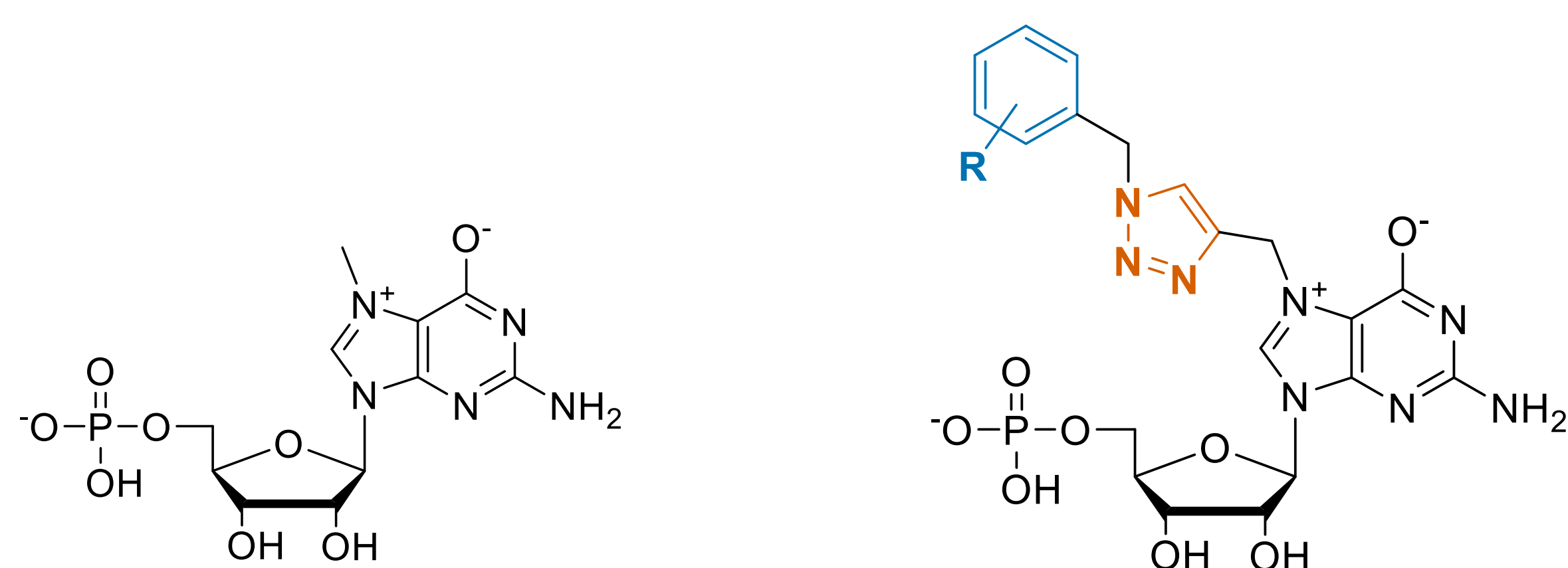
Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW

Wprowadzenie

Koniec 5' mRNA (kap) jest ważną biologicznie strukturą zaangażowaną w proces ekspresji genów, co czyni go istotnym miejscem modyfikacji związanych z kontrolowaniem procesów metabolizmu RNA oraz produkcji białek.

Dotychczasowe badania analogów tej struktury wykazały, że wprowadzenie ugrupowania triazolowego w obrębie łańcucha fosforanowego bądź zamiana grupy N7-metylowej na grupę benzylową może znacząco wpływać na ich właściwości biologiczne. Opisane w literaturze analogi wykazują zwiększone powinowactwo do białka inicjującego translację - eIF4E^{[1][2]}, zostały również scharakteryzowane jako małowiązujące inhibitory 5'-nukleotydazy - cNIIIB^[3].

Celem tego projektu było otrzymanie i charakteryzacja analogów strukturalnych monofosforanu N7-metyloguanozyny, przy wykorzystaniu reakcji cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej jonami miedzi(I) (CuAAC). W otrzymywanych związkach do azotu N7 guanozyny poprzez linker metylenowy i ugrupowanie 1,2,3-triazolowe przyłączona była grupa benzylowa zawierająca dodatkowo podstawniki takie jak: atomy halogenów, grupy metylowe czy proste grupy funkcyjne.



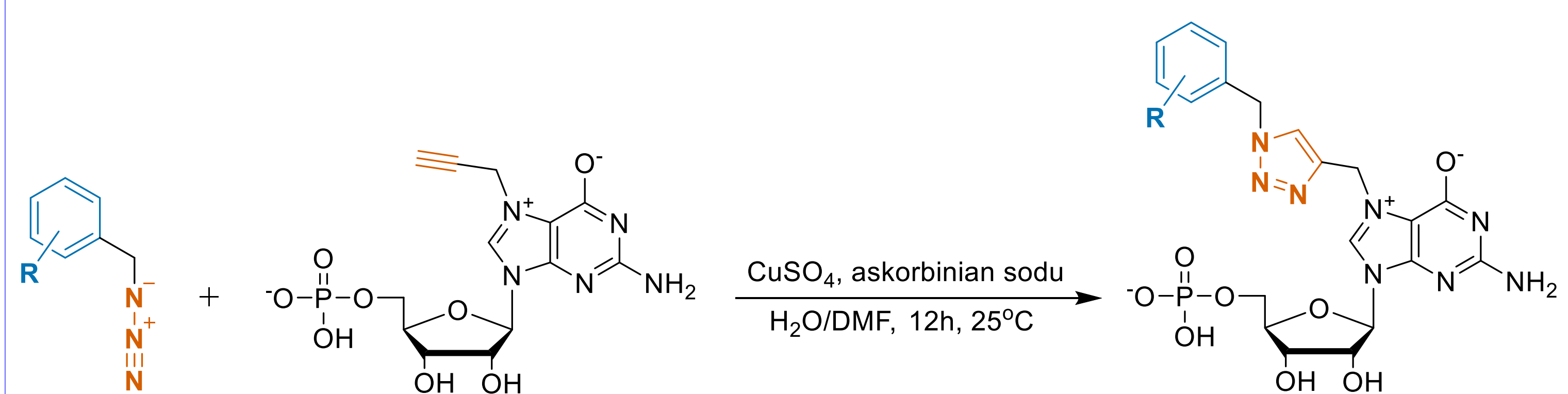
Rysunek 1. Po lewej: struktura monofosforanu 7-metyloguanozyny (m⁷GMP), po prawej: ogólny wzór strukturalny otrzymanych związków (R-Bn-Tr-7GMP).

Ścieżka syntezy

Pierwszym etapem projektu było przygotowanie substratów do reakcji cykloaddycji, w tym celu wykonano reakcję N⁷-alkilacji monofosforanu guanozyny przy wykorzystaniu bromku propargilowego zabezpieczonego grupą trimetylosilanową. Kolejnym krokiem było otrzymanie szeregu azydków benzylowych w reakcji substytucji nukleofilowej wybranych bromków benzylowych z azydkiem sodu.

Kluczową reakcją wykorzystywaną w syntezie była cykloaddycja Huisgena, należąca do szerokiej grupy reakcji „click”. Etap ten rozpoczynało od zdjęcia grupy ochronnej TMS z alkinowej pochodnej nukleotydu przy użyciu jonów fluorkowych, następnie do wodnego roztworu nukleotydu dodawano stechiometryczną ilość azydku benzylowego rozpuszczonego w DMF. Kończącym krokiem było dodanie do mieszaniny reakcyjnej roztworów siarczanu(VI) miedzi(II) i askorbinianu sodu w celu wygenerowania katalitycznych ilości jonów miedzi(I).

Reakcja cykloaddycji Huisgena w obecności jonów miedzi(I) jest niezwykle szybka i stereoselektywna, w podanych warunkach substraty łączą się z wysoką wydajnością poprzez trwały układ 1,2,3-triazolowy.



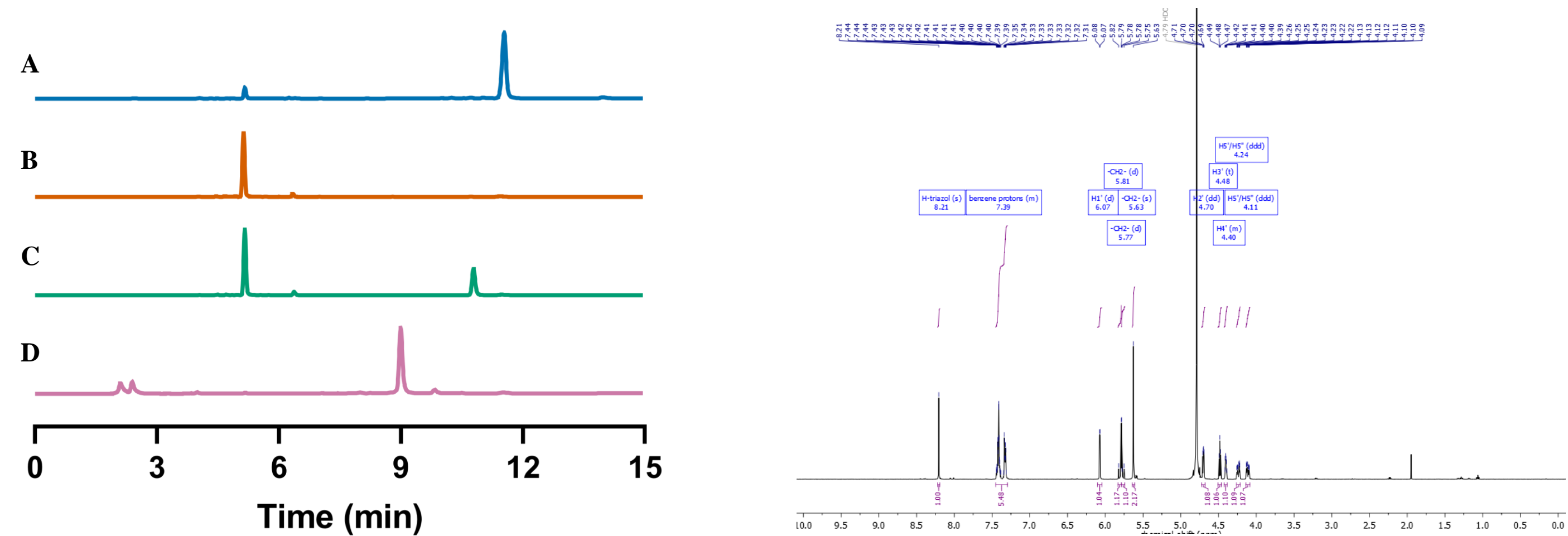
Rysunek 2. Schemat cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej jonami miedzi(I) - CuAAC.

Otrzymane Związki

Nr	Struktura	Nr	Struktura	Nr	Struktura	Nr	Struktura	Nr	Struktura	Nr	Struktura
5a		5b		5c		5d		5e		5f	
5g		5h		5i		5j		5k		5l	
5m		5n		5o		5p		5q		5r	
5s											

Charakteryzacja związków

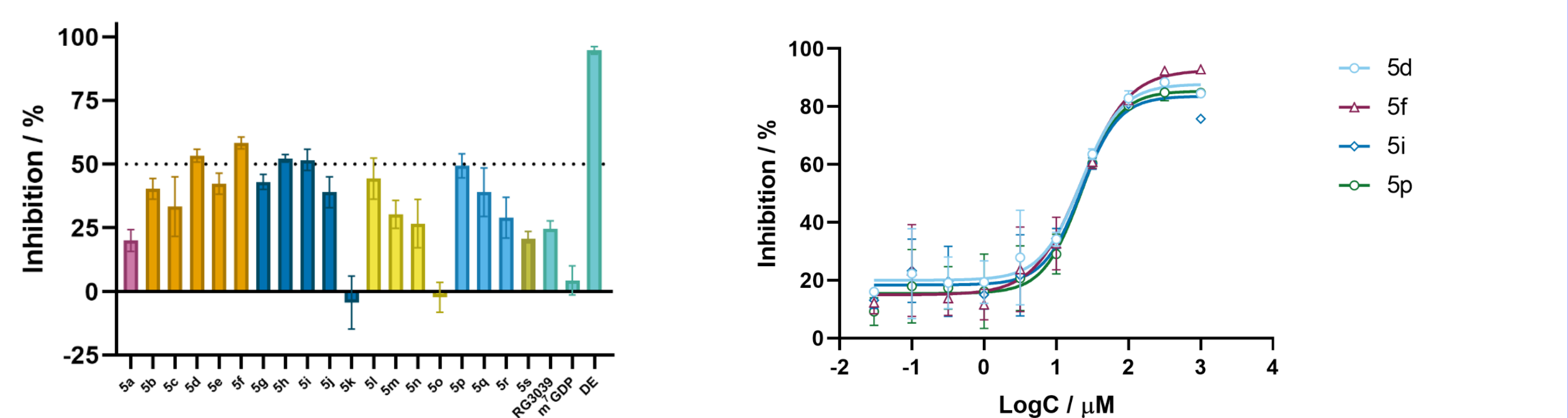
Postęp reakcji był monitorowany przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Otrzymane związki zostały scharakteryzowane dzięki zastosowaniu spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).



Rysunek 3. Po lewej: Chromatogramy RP-HPLC z syntezy związku 5a : A - zabezpieczony substrat, B - substrat po odbezpieczeniu, C - mieszanina reakcyjna przed dodaniem katalizatora, D - zakończona reakcja. Po prawej: Widmo ¹H NMR oczyszczonego związku 5a.

Właściwości biologiczne

Scharakteryzowane związki poddano serii badań biochemicznych, przeprowadzono pomiary mające na celu sprawdzenie czy otrzymane związki mogą stanowić inhibitory dla enzymów związanych z metabolizmem RNA - fosfataz z rodziny HIT. W tym celu wykorzystano opracowaną w naszym laboratorium metodę HTS opartą na 5'-fluorofosforanach nukleotydów i sondzie fluorescencyjnej^[3]. W wyniku przeprowadzonych badań możliwe było ocenienie jaki typ interakcji zachodzi pomiędzy danymi związkami a enzymami, a także obliczenie wartości parametru IC₅₀ dla poszczególnych analogów.



Rysunek 4. Po lewej: procentowe wartości inhibicji enzymu AtFhit przez poszczególne analogi w warunkach eksperymentu (20 μM inhibitora), po prawej: krzywe miareczkowania enzymu AtFhit wybranymi związkami.

Literatura

- [1] Walczak S., Sikorski P.J., Kasprzyk R., Kowalska J., Jemielity J., Org. Biolmol. Chem., 2018, 16, 6741
 - [2] Brown C.J., McNaie I., Fischer P.M., Walkinshaw M.D., J Mol Biol. 2007, 372(1), 7-15
 - [3] Kozarski M., Kubacka D., Wojtczak B.A., Kasprzyk R., Baranowski M.R., Kowalska J., Bioorg. Med. Chem., 2017, 26(1), 191-199
 - [4] Baranowski M.R., Nowicka A., Kowalska J., Jemielity J., Org. Biolmol. Chem., 2016, 14, 4594-4604
- Badania zostały sfinansowane ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu TEAM/2016-2/13.

Podsumowanie

- Uzyskałem z bardzo dobrymi wydajnościami dziewiętnaście nowych mononukleotydowych analogów kapu zawierających pierścienie 1,2,3-triazolowe.
- Struktury związków zostały potwierdzone metodami NMR oraz HRMS.
- Wprowadzenie ugrupowania triazolowego w obrębie zasady azotowej znacznie zmienia właściwości biologiczne związku. Istnieje możliwość potencjalnego wykorzystania otrzymanych związków jako inhibitorów fosfataz zaangażowanych w metabolizm RNA.