

## 232. Dérivés de nucléotides d'intérêt biologique VIII <sup>1)</sup>

### Synthèse de quelques analogues de l'acide adénosine-triphosphorique (ATP)

par A. Gabbai, I. Marcus, J. G. Falbriard et Th. Posternak

Laboratoires de Chimie biologique et organique spéciale de l'Université de Genève

(30 VIII 71)

*Summary.* Analogues of ATP belonging to the following classes have been prepared: N<sup>6</sup>-mono-acyl derivatives, N<sup>6</sup>-mono- and -di-alkyl derivatives, 6-deamino-ATP, 8-bromo-ATP, 8-amino-ATP and ATP-N(1)-oxide. With the exception of the last compound, the corresponding AMP derivatives have been used as intermediates in these preparations.

Il est inutile d'insister ici sur l'importance biochimique de l'ATP (XIII). On trouve dans la littérature divers travaux ayant pour but de modifier la structure de la molécule afin d'établir par certains essais des relations entre la constitution et l'activité biologique des analogues. Ce domaine a toutefois été insuffisamment exploré. Nous nous sommes proposé d'étendre ces recherches en modifiant la nature ainsi que l'emplacement des substituants du squelette purique. Le présent mémoire est consacré aux synthèses de quelques analogues de l'ATP appartenant aux types suivants:

1. Nous inspirant de nos travaux antérieurs sur l'AMP cyclique [2], nous avons préparé quelques dérivés acylés en N<sup>6</sup> de l'ATP (XIV–XVIII). Les restes acyle sont susceptibles d'être enlevés sous l'action d'amidases *in vivo*.

2. Nous avons introduit dans la molécule des groupes qui, à première vue, devraient résister à une attaque enzymatique. Il s'agit de groupements alkyle fixés en N<sup>6</sup> (XIX–XXII).

3. Le groupe NH<sub>2</sub> en position 6 a été supprimé (XXVIII).

4. Le squelette purique a été substitué en C(8) par Br (XXIII) ou NH<sub>2</sub> (XXIV).

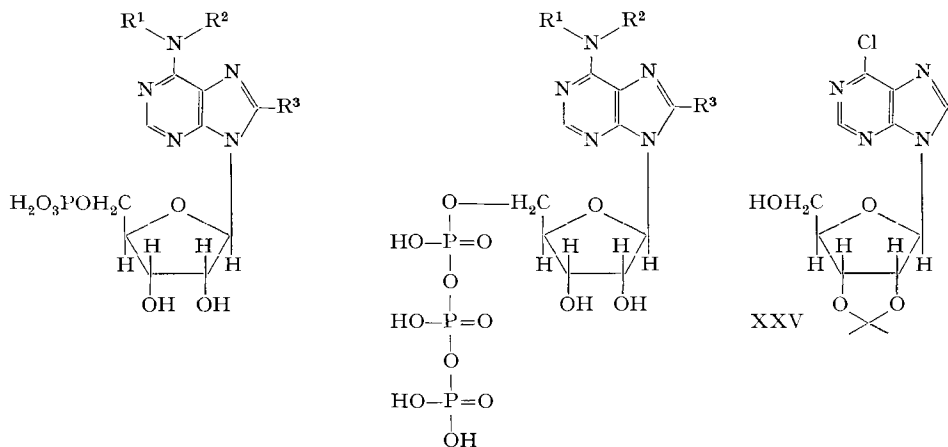
5. Par traitement de l'ATP au moyen d'acide peroxyphthalique on a obtenu le N(1)-oxy de XXIX.

Les procédés de synthèses d'analogues de l'ATP utilisent généralement comme produits de départ les AMP correspondants. Ces derniers ont d'ailleurs été employés également pour la préparation d'analogues de l'AMP cyclique [1] [3].

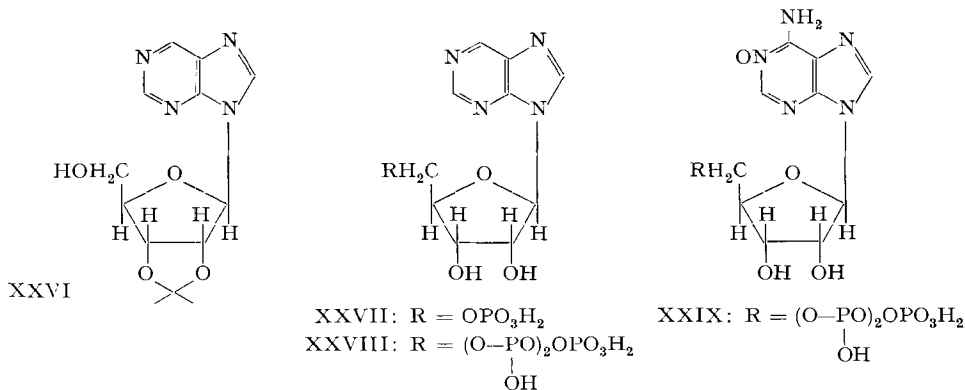
Le principe de préparation des acyl-N<sup>6</sup>-AMP est le suivant: par acylation énergétique de l'AMP dans la pyridine au moyen d'un anhydride d'acide, on obtient des dérivés acylés en N<sup>6</sup> et 2'-O. Les groupes ester étant très sensibles à l'hydrolyse alcaline, peuvent être enlevés sélectivement avec formation des dérivés mono-acylés en N<sup>6</sup> (II–VI).

Pour l'obtention d'alkyl-N<sup>6</sup>-AMP, nous partons de la chloro-6-(O-isopropylidène-2',3'-D-β-ribofuranosyl)-9-purine (XXV) [4], dont le chlore assez labile se laisse déplacer par substitution nucléophile, entre autres par traitement au moyen d'amines

<sup>1)</sup> Communication VII: [1].



- I:  $R^1 = R^2 = R^3 = H$   
 II:  $R^1 = H, R^2 = OCCH_3, R^3 = H$   
 III:  $R^1 = H, R^2 = OCCH_2CH_3, R^3 = H$   
 IV:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_2CH_3, R^3 = H$   
 V:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_3CH_3, R^3 = H$   
 VI:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_4CH_3, R^3 = H$   
 VII:  $R^1 = H, R^2 = CH_3, R^3 = H$   
 VIII:  $R^1 = CH_3, R^2 = CH_3, R^3 = H$   
 IX:  $R^1 = H, R^2 = n-C_4H_9, R^3 = H$   
 X:  $R^1 = H, R^2 = t-C_4H_9, R^3 = H$   
 XI:  $R^1 = R^2 = H, R^3 = Br$   
 XII:  $R^1 = R^2 = H, R^3 = NH_2$   
 XIII:  $R^1 = R^2 = R^3 = H$   
 XIV:  $R^1 = H, R^2 = OCCH_3, R^3 = H$   
 XV:  $R^1 = H, R^2 = OCCH_2CH_3, R^3 = H$   
 XVI:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_2CH_3, R^3 = H$   
 XVII:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_3CH_3, R^3 = H$   
 XVIII:  $R^1 = H, R^2 = OC(CH_2)_4CH_3, R^3 = H$   
 XIX:  $R^1 = H, R^2 = CH_3, R^3 = H$   
 XX:  $R^1 = R^2 = CH_3, R^3 = H$   
 XXI:  $R^1 = H, R^2 = n-C_4H_9, R^3 = H$   
 XXII:  $R^1 = H, R^2 = t-C_4H_9, R^3 = H$   
 XXIII:  $R^1 = R^2 = H, R^3 = Br$   
 XXIV:  $R^1 = R^2 = H, R^3 = NH_2$



primaires et secondaires, ce qui donne naissance à des isopropylidène-alkyl- $N^6$ -adénosines. On a introduit ainsi les groupes alkyle suivants: monométhyle, diméthyle<sup>2)</sup>, *n*-butyle et *t*-butyle. Pour la phosphorylation en 5', nous avons essayé plusieurs méthodes (emploi de l'acide cyanoéthyl-phosphorique, de l'acide di-*p*-nitrophényl-phosphorique, etc.). Le procédé le plus efficace est ici celui introduit récemment par *Yoshikawa* et *Yamazaki* [5], qui est basé sur un traitement par l'oxychlorure de phosphore dans le phosphate de méthyle. Par enlèvement des restes isopropylidène, on obtient ensuite les alkyl- $N^6$ -AMP.

Pour la préparation du désamino-6-AMP (XXVIII), nous avons toutefois traité l'(O-isopropylidène-2',3'-D-β-ribofuranosyl)-9-purine (XXVI) par l'acide cyanoéthylphosphorique. Le dérivé phosphorylé en 5' a été ensuite privé de son groupe isopropylidène.

Le bromo-8-AMP (XXIII) s'obtient par bromation directe de l'AMP [6]; il fournit de l'amino-8-AMP (XXIV) par traitement au moyen du méthanol saturé de gaz ammoniac anhydre.

Après de nombreux essais, nous avons adopté pour convertir les AMP en ATP la méthode de *Hoard & Ott* [7] en la modifiant convenablement. Elle consiste, comme on le sait, à traiter le dérivé de l'AMP par du carbonyle-diimidazole; on fait ensuite réagir l'«imidazolidate» formé avec du pyrophosphate. Le dérivé de l'ATP a été ensuite isolé et purifié suivant les méthodes décrites dans la partie expérimentale.

Les analogues de l'ATP ainsi obtenus sont destinés à être étudiés dans divers essais biologiques comportant l'emploi de cellules intactes. Pour l'instant, nous n'indiquerons que les résultats d'expériences effectuées avec deux enzymes qui utilisent l'ATP comme substrat, l'hexokinase et la glycérokinase [8].

Nous remercions de son appui le *Fonds National Suisse de la Recherche scientifique*.

### Partie expérimentale

*Méthodes.* Les spectres UV. ont été mesurés au moyen d'un appareil *Beckman DU*. Pour les chromatographies, on a utilisé le papier *Whatman 1* et la DEAE cellulose DE 11 Chromedia *Whatman*. Les chromatographies sur papier ont été effectuées généralement au moyen des systèmes de solvants suivants:

- A) Alcool-acétate d'ammonium 0,5 M dans H<sub>2</sub>O (5:2 en vol.)
- B) Propanol-2-ammoniac conc. –H<sub>2</sub>O (6:3:1 en vol.)
- C) Propanol-2-sulfate d'ammonium à 1% dans H<sub>2</sub>O (2:1 en vol.).

Le phosphore labile (P lab.) correspond au P minéralisé par une chauffe de 15 min. au bain-marie bouillant dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N<sup>3</sup>).

Pour l'analyse, les substances ont été séchées sous vide à 110°, sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

#### *Synthèses des acyl- et alkyl-N<sup>6</sup>-AMP et du désamino-AMP*

*Préparation des acyl-N<sup>6</sup>-AMP (II–VI).* 100 mg (0,275 mmole) d'acide adénosine-mono-phosphorique (I) (AMP) suspendus dans 4 ml de pyridine anhydre sont chauffés à l'ébullition à reflux jusqu'à dissolution complète, à l'abri de l'humidité, en présence de 6 ml d'anhydride d'acide. L'ébullition est encore poursuivie durant des temps variant avec la nature de l'anhydride: anhydrides acétique et propionique 10 min, anhydrides butyrique et valérique 15 min, anhydride hexanoïque 20 min. La pyridine est ensuite évaporée sous vide; on élimine autant que possible par distillation sous vide poussé l'excès d'anhydride d'acide, la température du bain ne dépassant pas 40°. Il est ainsi possible de se débarrasser totalement en quelques heures des anhydrides acétique et propionique; l'anhydride butyrique est éliminé en majeure partie. Les anhydrides de poids moléculaire plus élevé ne peuvent, par contre, être éliminés de cette manière. On reprend à 0° par un mélange de 2 ml d'eau et de 2 ml de pyridine. Après 1 h de séjour à temp. ordinaire, on évapore à siccité sous vide et cette suite d'opérations est répétée. On dissout ensuite soit dans 8 ml d'eau, soit dans un mélange de 4 ml d'eau et de 4 ml d'alcool. On refroidit dans la glace et ajuste par NaOH le pH à env. 8,0 (phénolphtaléine) puis, après réchauffement à température

- 2) Le dérivé diméthyl-N<sup>6</sup> s'obtient aussi par traitement du dérivé chloré XXV par la triméthylamine, par suite sans doute d'une décomposition du sel ammonium quaternaire formé intermédiairement.
- 3) Dans le cas d'un dérivé de l'ATP, le P lab. s'élève à 66,7% du P total.

ordinaire, on ajoute encore un volume de NaOH 1N correspondant à 1/9 du volume total, ce qui conduit à une concentration finale 0,1N en NaOH en excès. Après 6 min de séjour à température ordinaire, on neutralise à la phénolphthaléine par addition de Dowex 50 (forme H<sup>+</sup>). La suspension est ensuite versée sur une colonne de Dowex 50 de dimensions minimums 2,2 × 18 cm: on lave jusqu'à ce que le rapport des densités optiques  $D_{260\text{ nm}}/D_{272\text{ nm}} \geq 1$ . Comme tous les dérivés acylés en N<sup>6</sup> que nous avons préparés ont un  $\lambda_{\text{max}}$  de 272 nm et un  $\epsilon_{\text{max}}$  de 15 500, ces mesures UV. permettent de déterminer le rendement brut qui va de 72 à 88%. On concentre les liquides réunis sous vide, à une température inférieure à 30°, et extrait à l'éther les acides gras. Après neutralisation à la pyridine, on évapore à sec. On termine par une chromatographie sur une colonne (2,2 × 25 cm) de DEAE-cellulose (forme hydrogénécarbonate) en éluant par gradient de concentration au moyen d'eau additionnée graduellement d'hydrogénécarbonate de triéthylammonium 0,35M (pH 7,5). Débit: ~2 ml/min; volume des fractions 20–25 ml. On décèle les produits acylés en N<sup>6</sup> en déterminant de nouveau les rapports  $D_{260\text{ nm}}/D_{272\text{ nm}}$ ; les fractions pour lesquelles ce rapport est inférieure à 1 sont réunies et évaporées à sec sous vide à une température ne dépassant pas 30°. Il est recommandé, pour faciliter le départ du carbonate de triéthylammonium, de maintenir le pH au-dessous de 9 et d'ajouter fréquemment, à la fin de l'opération, du méthanol. Le sel de triéthylammonium de l'AMP acylé est séché à fond sous vide à température ordinaire. On reprend par 2 ml de méthanol, élimine l'insoluble par centrifugation et ajoute, en agitant, 2 ml d'une solution acétonique 0,5M de perchlorate de sodium, puis 4 ml d'acétone anhydre. Le précipité, d'abord gélatineux, devient pulvérulent après quelques heures de séjour à 0°. On le recueille par centrifugation, lave à 4 reprises avec 0,5 ml d'acétone anhydre et sèche sous vide. Le sel sodique peut être reprécipité dans des conditions analogues. On peut le conserver sans altération durant plusieurs mois à –15° à l'abri de l'humidité. Les caractères des sels de sodium des dérivés acyl-N<sup>6</sup> sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1. Dérivés acylés en N<sup>6</sup> de l'AMP

Substances	Formules brutes	Calculé %				Trouvé %				Rdt. en % (Système porté à l'AMP)	Rf (Système C)
		C	H	N	P	C	H	N	P		
II	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PNa <sub>2</sub>	33,26	3,26	16,17	7,15	33,52	3,21	16,04	6,76	58	0,44
III	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PNa <sub>2</sub>	34,91	3,58	15,67	6,93	34,76	3,64	15,65	6,59	78	0,51
IV	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PNa <sub>2</sub>	36,45	3,93	15,18	6,72	36,49	3,93	15,34	6,35	75	0,63
V	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PNa <sub>2</sub>	37,90	4,24	14,75	6,52	37,70	4,30	14,64	6,41	75	0,72
VI	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> PNa <sub>2</sub>	39,27	4,53	14,31	6,33	39,04	4,66	14,17	6,13	45	0,77

Tous les dérivés acyl-N<sup>6</sup> décrits présentent:  $\lambda_{\text{max}}$  271–272 nm,  $\epsilon_{\text{max}}$  15000–15400.

*O-Isopropylidène-2',3'-alkyl-N<sup>6</sup>-adénosines.* La condensation de la chloro-6-(O-isopropylidène-2',3'-D-β-ribofuranosyl)-9-purine (XXV) [4] (1 g) avec la monométhylamine et la diméthylamine en solution aqueuse à 40% (15 ml) a été effectuée par une chauffe de 15 h. en tube scellé à 80°.

Dans le cas du dérivé monométhylé, on évapore à sec et le résidu est coévaporé trois fois avec de l'éthanol anhydre. Après dessiccation sous vide poussé durant 15 h à température ordinaire, l'huile obtenue est utilisée directement pour la phosphorylation; elle est homogène à la chromatographie sur couche mince de silice (système *n*-butanol saturé d'acide borique et système chloroforme-méthanol 95:5 en vol).

Le dérivé diméthylé cristallise directement dans le mélange réactionnel: obtenu 0,65 g de F. 180–182° après recristallisation dans l'éthanol. Le même composé a été obtenu avec un bon rendement lors d'essais de préparations d'un dérivé de base ammonium quaternaire. 400 mg du dérivé chloré XXV sont suspendus dans 4 ml d'un mélange de 2 ml de triméthylamine anhydre et de 4,7 ml de diméthylformamide. On chauffe en tube scellé 4 h à 70°. Après évaporation à sec et recristallisation dans 6 ml de méthanol, on obtient au total 329 mg (77,5%) de dérivé diméthylé de F. 179–180°.

Tableau 2. Dérivés alkylés en N<sup>6</sup> de l'AMP

Subs-tances	F.	Formules brutes	Calculé %			Trouvé %			λ <sub>max</sub> en nm	ε <sub>max</sub>	Rf Systèmes				
			C	H	N	C	H	N			A	B	C		
VII	184-185°	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	36,57	4,46	19,40	8,58	36,68	5,09	19,50	8,50	268	16900	0,21	0,30	0,33
VIII	225-230°	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	38,40	4,83	18,66	8,26	38,08	4,94	18,84	7,83	274	18400	0,30	0,37	0,61
IX	155-158°	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	41,69	5,50	17,37	7,68	41,15	5,56	17,14	-	266	14000	0,50	-	0,75
X	-	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> PNa <sub>2</sub>	37,59	4,51	15,67	6,93	37,74	4,42	15,76	7,15	{216	15200}	0,51	0,66	0,75
										216	11200}				

Tableau 3. Analogues de l'ATP

Subs-tances	Formules brutes	Calculé %			Trouvé %			P lab. en %	Rdt. <sup>1)</sup> en %	λ <sub>max</sub> en nm	ε <sub>max</sub>	Rf (système C)		
		C	H	N	C	H	N						P org.	
XIV	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O <sup>2)</sup>	-	-	-	13,45	-	-	13,40	67,8	15	15500	0,15		
XV	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	24,00	2,48	10,76	14,28	24,70	10,53	14,92	68,9	9	17400	0,26		
XVI	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	25,28	2,73	10,53	13,97	25,13	2,70	10,36	13,17	65,4	13	15600	0,45	
XVII	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	26,52	2,97	10,31	13,69	26,83	3,24	10,62	13,00	63,5	13	15300	0,53	
XVIII	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	27,71	3,21	10,10	13,41	27,49	3,37	9,89	13,57	66,6	15	272	15300	0,57
XIX	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	21,68	2,32	11,50	15,26	21,90	2,53	11,42	14,84	65,9	27	265	15500	0,31
XX	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	23,12	2,59	11,24	14,92	22,94	2,84	11,14	14,84	66,5	27	274	16200	0,38
XXI	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	25,82	3,10	10,75	14,28	25,99	3,29	10,70	14,80	68,4	18	267	15850	0,58
XXII	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	25,82	3,10	10,75	14,28	25,95	3,21	10,61	14,20	67,5	32	269	16500	0,61
XXVIII	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	20,71	1,91	9,66	16,03	20,51	2,23	9,36	16,05	70,8	-	264	7400	0,25
XXIII	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	-	-	10,39	-	-	-	10,24	-	67,5	22	265	17400	0,19
XXIV	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub>	-	-	13,82	-	-	-	13,62	-	67,4	15	274	17000	0,10

1) Rendements (rapportés aux AMP) en substances purifiées; les rendements réels sont plus élevés.

2) Substance séchée au dessiccateur à température ordinaire.

Pour la préparation du *dérivé t-butylé*, on traite le *dérivé chloré* (50 mg) par la *t*-butylamine anhydre (1 ml). La chromatographie (*n*-butanol saturé d'eau) montre une tache principale de Rf 0,75. Après évaporation à sec sous vide poussé, reprise par le chloroforme, nouvelle évaporation à sec et dessiccation de 15 h sous vide poussé, le produit peut être utilisé tel quel pour la phosphorylation. Il est toutefois préférable d'éliminer comme suit les traces de butylamine en excès qui semblent entraver cette phosphorylation subséquente: on reprend par 1 ml de méthanol et évapore en présence de 0,5 g de silicagel *Merck* (0,05–0,20). Cette silice imbibée de produit est introduite au sommet d'une colonne (15,5 × 0,8 cm) du même si icagel. On élue au moyen du mélange éthanol-chloroforme (10:90 en vol.) en recueillant des fractions de 1 ml. Les fractions N° 7–13, qui contiennent le produit cherché (qu'on détecte par spectroscopie UV.), fournissent par évaporation un résidu gommeux qui est ensuite phosphorylé.

*Alkyl-N<sup>6</sup>-AMP* (VII–X). L'alkyl-N<sup>6</sup>-isopropylidène-adenosine purifiée (0,7 mmole) ou le produit brut provenant de 1 mmole du *dérivé chloré* XXV sont dissous dans 4 ml de phosphate triméthylrique. On ajoute, en agitant, en l'espace de 4 minutes, à 0–4° 0,36 ml d'oxychlorure de phosphore fraîchement distillé. On laisse dans la glace durant 5–6 h à l'abri de l'humidité, puis on ajoute 25 g de glace pilée. Après 1 h d'agitation à 4°, on introduit de l'ammoniaque concentrée jusqu'à obtention d'un pH stable de 1,5. Pour éliminer le reste iropropylidène, on chauffe à 80–90° durant 1 h. puis on ajuste le pH à 7,0 au moyen d'ammoniaque concentrée. La solution contient de fortes quantités de P minéral. Pour les éliminer, nous les avons d'abord précipitées comme phosphate de baryum, mais un meilleur procédé consiste à adsorber le nucléotide sur du charbon. La solution est agitée 10 minutes avec 10 g de charbon actif préparé d'après [9]. Onessore et lave à l'eau jusqu'à disparition des ions Cl<sup>-</sup>. On extrait le nucléotide par agitation du charbon avec 400 ml du mélange ammoniaque concentrée-eau-méthanol (15:35:50 en vol). La récupération du nucléotide va de 60 à 90%. On évapore ensuite à sec. On obtient les monométhyl-, diméthyl- et *n*-butyl-AMP VII, VIII et IX à l'état cristallisé en reprenant le résidu par 2–3 ml d'eau et en ajustant le pH à 1,5 par l'acide chlorhydrique concentré. La cristallisation du monométhyl- et du diméthyl-N<sup>6</sup>-AMP est complétée par addition d'alcool. Les rendements rapportés au *dérivé chloré* XXV atteignent respectivement 57% (monométhyl-AMP VII)<sup>4</sup>), 35% (diméthyl-AMP VIII)<sup>4</sup>), 39% (*n*-butyl-AMP IX).

Dans le cas du *t*-butyl-N<sup>6</sup>-AMP (X), on est obligé de purifier le sel d'ammonium (obtenu après élution du charbon et évaporation) par chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose, dans les conditions habituelles. Les fractions contenant le nucléotide sous forme de sel de triéthylammonium sont évaporées à sec et le produit est précipité comme sel de sodium de la manière indiquée plus haut, avec un rendement rapporté au *dérivé chloré* atteignant 55%.

Quelques caractères des *dérivés alkylés* en N<sup>6</sup> de l'AMP sont indiqués dans le tableau 2.

*D-β-Ribofuranosyl-9-purine-5'-phosphate* (XXVII). La ribosyl-9-purine obtenue à partir du *dérivé chloré* en 6 par hydrogénéolyse catalytique [11] est condensée avec l'acétone en présence de diméthoxypropane, c'est-à-dire dans des conditions quelque peu modifiées par rapport à celles décrites dans [12]. 880 mg de nucléoside sont suspendus dans un mélange de 700 ml d'acétone anhydre et de 50 ml de 2,2-diméthoxypropane. On ajoute 6,5 g de monohydrate d'acide *p*-toluènesulfonique et agite 45 min à température ordinaire; au bout d'une dizaine de minutes déjà, le nucléoside est dissous. On neutralise en versant dans la quantité équivalente d'hydrogencarbonate de sodium à 5%, puis on évapore à sec. Le résidu est déshydraté par deux coévaporations avec du benzène. On extrait ensuite à trois reprises avec 50 ml de benzène. Les solutions benzéniques laissent après évaporation un résidu qui, à la chromatographie dans le système A, contient un produit principal XXVII de Rf 0,78 à côté d'une impureté indéterminée de Rf 0,82.

La phosphorylation de l'(O-isopropylidène-2',3'-D-β-ribofuranosyl)-9-purine (XXVI) avait déjà été effectuée au moyen de chlorophosphate dibenzyle [13]. Nous avons utilisé l'acide cyanoéthyl-phosphorique, ce qui simplifie considérablement les opérations.

Le *dérivé isopropylidénique* XXVI (500 mg, 3 mmoles) dissous dans 5 ml de pyridine est additionné de 3 ml d'une solution 1 M d'acide cyanoéthyl-phosphorique dans un mélange de pyridine et d'eau. Après évaporation à sec et dessiccation sous vide poussé, on reprend par 9 ml de pyridine anhydre et ajoute 1,9 g (9 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 15 h de séjour à température ordinaire, on introduit 9 ml d'eau, etessore la dicyclohexylurée qu'on lave avec au total 10 ml

<sup>4</sup>) Ces produits avaient déjà été préparés à l'état impur par une méthode plus compliquée [10].

d'un mélange à volume égal de pyridine et d'eau. La phosphorylation étant incomplète, comme l'indique la chromatographie sur papier, on la répète: après évaporation à sec, on traite, dans les conditions décrites ci-dessus, dans 9 ml de pyridine au moyen de 2 mmoles d'acide cyanoéthylphosphorique et de 6 mmoles de dicyclohexylcarbodiimide. Après concentration à 5 ml du filtrat de la dicyclohexylurée, on ajoute 5 ml d'ammoniaque concentrée et chauffe 1 h à 65°. On ajuste ensuite le pH à 1,5 au moyen de HCl conc. et chauffe 1 h à 70° pour enlever le reste isopropylidène. Après neutralisation à pH 6,0–6,5, on agite 10 min avec 5 g de charbon actif. Après essorage et lavage du charbon au moyen de 150 ml d'eau distillée, on extrait par, au total, 290 ml du mélange éthanol-eau-ammoniac conc. (60:35:5 en vol.). Rendement: 44%, Rf.: système A 0,18, système C 0,45. A pH 5,5,  $\lambda_{\max}$  264 nm,  $\epsilon_{\max}$  7400.

La substance est homogène à la chromatographie, bien que l'analyse centésimale n'ait pas donné de résultats satisfaisants. On convertit en sel de pyridinium par passage sur une colonne de Dowex 50 (forme pyridinium) et procède ensuite à la transformation en ATP suivant la méthode générale (voir plus loin).

*8-Amino-AMP (XXIV)*. L'halogène en position 8 est beaucoup moins réactif qu'en position 6. La méthode suivante permet cependant de remplacer le brome en C(8) du 8-bromo-AMP sans hydrolyse notable de l'ester phosphorique:

426 mg de 8-bromo-AMP [6] sont dissous dans 2,5 ml de formamide. Après addition de 10 ml de méthanol anhydre saturé de gaz ammoniac, on chauffe 48 h en tube scellé à 90°. Après évaporation du méthanol, on reprend par 10 ml d'eau et on fractionne sur une colonne de DEAE-cellulose (forme hydrogencarbonate) de la manière indiquée précédemment. A côté d'un peu de produit de départ, le dérivé cherché est accompagné d'une impureté résultant probablement d'une attaque de l'halogène par le formamide. Le 8-amino-AMP se trouve dans les fractions N° 50–70 qui contiennent 70% du P mis en œuvre. Le produit est homogène à la chromatographie sur papier dans les systèmes A et C.  $\lambda_{\max}$  274 nm,  $\lambda_{\min}$  233 nm;  $\epsilon_{\max}$  16100,  $\epsilon_{\min}$  2500.

#### Préparation d'analogues de l'ATP

*Préparation des acyl-N<sup>6</sup>-ATP (XIV–XVIII)*. Il n'est pas nécessaire de partir des sels de sodium purifiés des acyl-N<sup>6</sup>-AMP. Le plus simple est d'utiliser le produit brut obtenu (à partir de 100 mg d'AMP) après passage sur Dowex 50 et débarrassé éventuellement de l'acide gras par extraction à l'éther<sup>5)</sup>. La solution aqueuse concentrée à 10–20 ml est additionnée de tri-*n*-butylamine jusqu'à pH 5,0 (ce qui correspond approximativement à 1 équivalent de base par atome de phosphore). Si l'on part du sel sodique d'un acyl-N<sup>6</sup>-AMP, il faut le convertir préalablement en sel de pyridinium par passage sur une colonne de Dowex 50 (forme pyridinium) et ajouter ensuite par atome de phosphore un équivalent de tri-*n*-butylamine.

On ajoute ensuite de la pyridine jusqu'à pH 8,0, évapore à sec sous vide, reprend par 5 ml de pyridine et évapore de nouveau à sec. Ces opérations sont répétées deux fois. On dissout dans le diméthylsulfoxyde sec et ajoute par atome-g de phosphore 5 moles de N-carbonyldiimidazole. On abandonne ensuite à l'obscurité à l'abri de l'humidité et à température ordinaire. Il est recommandé de déboucher le flacon de temps à autre, vu le dégagement de CO<sub>2</sub>. Le cours de la réaction est suivi par chromatographie sur papier dans le système B. Au bout de trois jours, le produit de départ a généralement disparu. On introduit alors par atome-mg de P, 8 mmoles de pyrophosphate. Ce dernier est préparé sous forme de sel de *t*-butylammonium, comme indiqué [7], à cette différence près que le produit est dissous finalement dans du diméthylsulfoxyde anhydre (10 ml par mmole de pyrophosphate) et non dans le diméthylformamide.

La réaction s'accomplit généralement durant 4–5 jours à température ordinaire à l'abri de l'humidité. Son cours est suivi de nouveau par chromatographie sur papier (système B). On verse ensuite le mélange en agitant continuellement dans deux volumes d'eau glacée en évitant d'entraîner le précipité formé, qu'on lave à deux reprises par décantation au moyen de 5 ml de diméthylsulfoxyde. On soumet ensuite en chambre froide à la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (forme hydrogencarbonate). Après avoir versé la solution sur la colonne, on lave au moyen de 250–500 ml d'eau pour éliminer le diméthylsulfoxyde, puis on fractionne par gradient

<sup>5)</sup> Il est toutefois nécessaire de partir d'un hexanoyl-N<sup>6</sup>-AMP purifié, sinon l'ATP correspondant contiendrait une impureté impossible à éliminer sur colonne de DEAE-cellulose.

de concentration en procédant de la manière décrite plus haut. On recueille au total 200 fractions de 20–25 ml dans lesquelles on localise les dérivés de l'ATP par spectrophotométrie UV. à 260 et 272 nm comme indiqué plus haut. On évapore à sec les fractions convenables en prenant les précautions mentionnées. Les analogues de l'ATP ainsi obtenus sont souvent souillés de pyrophosphate. Nous avons éliminé ce dernier soit par: a) adsorption sur charbon actif suivie de lavage à l'eau et d'éluion par un mélange d'alcool et d'ammoniaque; b) précipitation comme sel de plomb qu'on traite par le carbonate de sodium.

Dans le cas des N<sup>6</sup>-acyl-ATP on a recouru de préférence à la méthode b). Le produit d'une teneur totale en P connue, dissous dans 2,3 ml d'eau, est précipité par un petit excès d'acétate de plomb 0,5M. On centrifuge et lave à l'eau le précipité qui est ensuite trituré, avec addition graduelle de carbonate de sodium 2M, jusqu'à ce que le pH de la phase liquide atteigne 8,0. Dans ces conditions, les pyrophosphates et phosphates minéraux de plomb ne sont pas décomposés, alors que les dérivés phospho-organiques passent à l'état de sels sodiques solubles. Après centrifugation et lavage, la solution est passée sur une colonne de Dowex 50 (forme pyridinium), puis fractionnée dans les conditions déjà indiquées, sur une colonne de DEAE-cellulose. L'ATP substitué est généralement contenu dans les fractions N° 100–150. Si l'on désire un produit très pur, exempt de l'ATP non acylé et des dérivés de l'ADP, il ne faut recueillir que le cœur des fractions chromatographiques. Le produit est finalement précipité comme sel tétrasodique dans les conditions indiquées pour les sels des AMP. Une fois bien séché, il se conserve sans altération durant plusieurs mois à –15°, à l'abri de l'humidité (tableau 3).

*Préparations des alkyl-N<sup>6</sup>-ATP, des ATP substitués en C(8) et du désamino-6-ATP.* On a converti d'abord les AMP en sels de pyridinium (sans addition de tri-*n*-butylamine). La transformation en «imidazolidate», effectuée comme indiqué plus haut, est beaucoup plus rapide que dans le cas des acyl-N<sup>6</sup>-ATP. Il en est de même de la réaction de l'«imidazolidate» avec le pyrophosphate. Dans les deux cas, on a laissé reposer 15–24 h le mélange réactionnel. Après fractionnement sur la DEAE-cellulose, on élimine les pyrophosphates et phosphates minéraux suivant les méthodes a) ou b) indiquées ci-dessus, la méthode a) étant généralement plus pratique. L'adsorption s'effectue en employant environ 8 g de charbon pour 0,30 mmole d'AMP de départ, selon le procédé indiqué ci-haut pour les alkyl-N<sup>6</sup>-AMP. Après l'éluion suivie d'évaporation à sec, on doit, comme après emploi de la méthode b), refractionner sur colonne de DEAE-cellulose. Le produit est finalement précipité comme sel tétrasodique (tableau 3)<sup>6)</sup>.

*Oxydo-N(1)-ATP (XXIX).* Cette substance a été préparée de la même manière que le dérivé correspondant de l'AMP cyclique [2]. 100 mg d'ATP (sel disodique) dissous dans 4 ml d'eau sont additionnés de 0,7 ml d'une solution 0,74 M d'acide peroxyphthalique dans l'éther. Après évaporation de l'éther, on ajuste le pH à 5,0 par NaOH 1N. On laisse encore réagir 4 jours à l'obscurité en ajoutant tous les jours 0,5 ml de la solution d'acide peroxyphthalique et en ajustant le pH à 5,0. La chromatographie sur papier indique alors la disparition pratiquement complète de l'ATP de départ. On ajuste le pH à 2,0 et élimine par extraction au chloroforme les acides phthalique et peroxyphthalique. Le rapport des densités optiques à 231 et 260 nm est égal à 3,95, ce qui est très proche du rapport 4,2 indiqué pour des dérivés oxydo-N(1)-analogues [2] [15]. Le produit est homogène à la chromatographie et sa solution a été utilisée telle quelle pour des essais enzymatiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Th. Posternak, I. Marcus & G. Cehovic*, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. 272 D, 622 (1971).
- [2] *Th. Posternak, E. W. Sutherland & W. F. Henion*, Biochim. biophysica Acta 69, 558 (1962); *J. G. Falbriard, Th. Posternak & E. W. Sutherland*, *ibid.* 148, 99 (1967).
- [3] *G. Cehovic, I. Marcus, S. Vengadabady & Th. Posternak*, C.r. Séances Soc. Physique Hist. natur. Genève 3, 135 (1968); *Th. Posternak, I. Marcus, A. Gabbai & G. Cehovic*, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. 269 D, 2409 (1969).
- [4] *J. Zemlicka & F. Sorm*, Czech. Pat. N° 110 944 (1964); *A. Hampton & M. H. Maguire*, J. Amer. chem. Soc. 83, 150 (1961).

<sup>6)</sup> Les monométhyl- et diméthyl-N<sup>6</sup>-ATP XIX et XX avaient déjà été obtenus par d'autres méthodes [14], mais ils n'avaient pas été purifiés.



- [5] *M. Yoshikawa & T. Kato*, Bull. chem. Soc. Japan 40, 2489 (1967); *A. Yamazaki, I. Kumashiro & T. Takenishi*, J. org. Chemistry 33, 2585 (1968).
- [6] *M. Ikehara, S. Uesigi & M. Kaneko*, Chem. Commun. 1, 17 (1967).
- [7] *D. E. Hoard & D. G. Ott*, J. Amer. chem. Soc. 87, 1785 (1965).
- [8] *A. Gabbai & Th. Posternak*, Helv. 54, 2141 (1971).
- [9] *R. D. Hurst & G. C. Becking*, Canad. J. Biochem. Biophysics 41, 469 (1963).
- [10] *M. Ikehara, E. Ohtsuka & F. Ishikawa*, Chem. pharm. Bull. Japan 9, 173 (1961).
- [11] *M. P. Gordon, V. S. Weliki & G. B. Brown*, J. Amer. chem. Soc. 79, 3245 (1957); *G. B. Brown & V. S. Weliki*, J. biol. Chemistry 204, 1019 (1953).
- [12] *A. Hampton & D. I. Magrath*, J. Amer. chem. Soc. 79, 3250 (1957).
- [13] *D. I. Magrath & G. B. Brown*, J. Amer. chem. Soc. 79, 3252 (1957).
- [14] *M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, K. Yagi & Y. Tonomura*, J. Amer. chem. Soc. 83, 2679 (1961).
- [15] *H. Klenow & S. Frederickson*, Biochim. biophysica Acta 52, 384 (1961).

### 233. Dérivés de nucléotides d'intérêt biologique, IX<sup>1)</sup>

#### Essais enzymatiques avec des analogues de l'acide adénosine-triphosphorique (ATP)

Communication préliminaire<sup>2)</sup>

par **A. Gabbai et Th. Posternak**

Laboratoires de Chimie biologique et organique spéciale de l'Université de Genève

(30 VIII 71)

*Summary.* The reactivity, as substrates for hexokinase and glycerokinase, of some analogous of ATP has been compared with that of ATP.

Certains des analogues décrits précédemment [1] ont été essayés comme substrats de deux kinases: l'hexokinase et la glycérokinase. Les travaux avec le deuxième enzyme n'ont qu'un caractère préliminaire, alors que les essais avec l'hexokinase ont été plus approfondis et comportent des mesures de  $V_{\max}$  et de  $K_m$ .

Nous avons utilisé l'hexokinase de levure cristallisée *Sigma* et la glycérokinase *Boehringer*.

*Hexokinase.* Pour les essais avec l'hexokinase, nous avons recouru essentiellement à la méthode spectrophotométrique basée sur la déshydrogénation, en présence d'un grand excès de glucose-6-phosphate-déshydrogénase, de l'acide glucose-6-phosphorique formé. Cette réaction est étudiée par l'observation au spectrophotomètre de la densité optique à 366 nm (mesure de la concentration en NADPH), ce qui permet de suivre le cours de la phosphorylation du glucose [2]. Les  $K_m$  et  $V_{\max}$  ont été déterminés par la représentation graphique classique de *Lineweaver & Burke* ( $1/V$  vs  $1/[S]$ ). Dans les essais (tableau 1) on a opéré à une concentration saturante en glucose. Les concentrations en ATP ou en analogue variaient généralement entre les limites  $5,3 \cdot 10^{-4}M$  et  $5,3 \cdot 10^{-5}M$ ; dans certains cas, cette concentration atteignait

<sup>1)</sup> Communication VIII: [1].

<sup>2)</sup> Un mémoire détaillé sera présenté à Helv. pour publication.