



УДК 547.491 : 6 : 547.963.32

**ПОЛУЧЕНИЕ γ -АМИДОВ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ
С ПОМОЩЬЮ ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИИМИДА *****Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.***Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Показано, что активные производные нуклеозид-5'-трифосфатов, образующиеся при взаимодействии водорастворимого карбодиимида с нуклеозид-5'-трифосфатами, практически мгновенно и количественно реагируют с аминами с образованием соответствующих амидов нуклеозид-5'-трифосфатов. Используя реакцию аминов с активными производными нуклеозид-5'-трифосфатов, синтезированы анилиды АТР, dАТР, УТР, GТР; бензиламид АТР и морфолид АТР. На примере анилида АТР и бензиламида АТР показано, что фосфамидная связь в этих соединениях образована γ -атомом фосфора.

Нуклеозид-5'-трифосфаты, в особенности АТР, являются субстратами в многочисленных ферментативных системах — фосфотрансферазных, нуклеотидилтрансферазных, синтетазных. В связи с этим представляет значительный интерес получение производных нуклеозидтрифосфатов для использования их в качестве аналогов субстратов и для аффинной модификации соответствующих ферментов. Одним из возможных классов аналогов могут быть амиды нуклеозидтрифосфатов по γ -фосфатному остатку. Можно ожидать, что в ряде случаев такие производные будут в значительной степени сохранять способность молекулы к специфическим взаимодействиям с ферментами, поскольку в них остаются неизменными углеродный фрагмент и гетероциклическое основание и лишь на единицу изменяется заряд трифосфатного фрагмента.

Ранее [1, 2] описано получение амидов ADP и АТР — производных метилового эфира фенилаланина — с помощью дициклогексилкарбодиимида и получение имидазолида ADP с помощью карбонилдиимидазола [3].

В настоящей работе для получения амидов нуклеозид-5'-трифосфатов мы исследовали возможность использования обнаруженной нами ранее [4] реакции АТР с ЦМЭ-карбодиимидом, приводящей к образованию аденозин-5'-триметафосфата [5]. Аналогичные производные образовывались и при использовании других нуклеозидтрифосфатов. Легкость, с которой протекает гидролиз этих производных, свидетельствует о том,

* Принятые сокращения: ЦМЭ-карбодиимид — *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*- β -(4-метилморфолиний)этил карбодиимида; *N*-нуклеотидил-ЦМЭ-мочевина — *N* (*N'*)-нуклеотидил-*N*-циклогексил-*N'*- β -(4-метилморфолиний)этил мочевина; ТЭАБ — триэтиламонийбикарбонат.

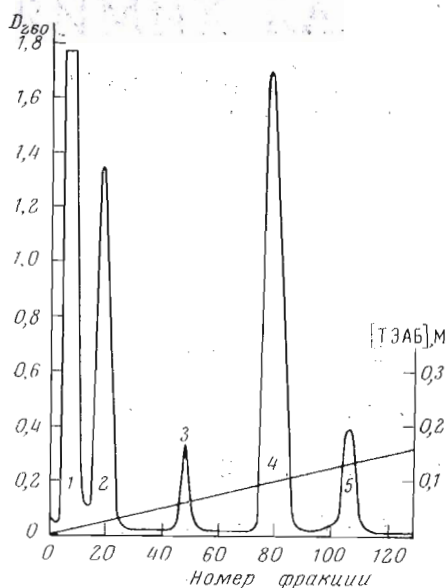


Рис. 1

Рис. 1. Профиль элюции при хроматографии 2 мл конечной реакционной смеси (исходный состав: АТР — 3 мМ; ЦМЭ-карбодимид — 60 мМ, после прекращения роста рН добавлено 0,7 мл анилина) на колонке с DEAE-целлюлозой: 1 — анилин; 2 — *n*-толуолсульфонат-ион; 3 — неидентифицированный продукт; 4 — амид АТР; 5 — АТР

Рис. 2. УФ-спектры: 1 — АТР; 2 — амид АТР; 3 — бензиламид АТР (рН 10)

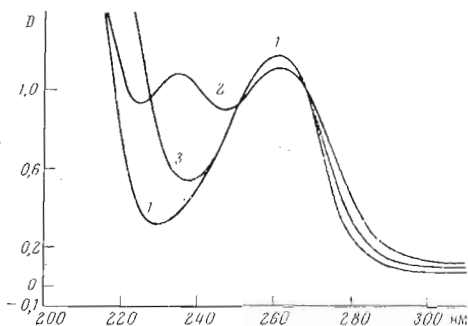


Рис. 2

что они обладают высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным реагентам и, в частности, должны активно взаимодействовать с аминами, давая соответствующие амиды.

За реакцией образования нуклеозид-5'-триметафосфатов следили по расходу кислоты, необходимой для поддержания постоянного значения рН реакционной смеси. Выход этих производных (при рН 5,6, 11°, 3 мМ концентрации нуклеозидтрифосфата, 60 мМ ЦМЭ-карбодимид) превышает 90% по нуклеозидтрифосфату. После достижения максимальной концентрации нуклеозид-5'-триметафосфата в реакционную смесь добавляли соответствующий амин и далее проводили разделение и анализ реакционной смеси. Данные об установлении структуры полученных продуктов приведены на примере продукта взаимодействия активного производного АТР с анилином.

На рис. 1 представлены результаты хроматографии на DEAE-целлюлозе реакционной смеси, полученной при взаимодействии активного производного нуклеозидтрифосфата с избытком анилина. Видно, что смесь содержит пять регистрируемых по УФ-поглощению компонентов. Пики 1 и 2 соответствуют исходным анилину и *n*-толуолсульфонат-иону (идентифицированы по УФ-спектру и сравнением с заведомым образцом). Пики 3—5 — веществами нуклеотидной природы, причем последнее из них представляет собой АТР.

В пике 3 содержится соединение, элюирующееся при более низкой концентрации ТЭАБ, чем АТР, и, по-видимому, имеющее меньший заряд. Выход этого побочного продукта составляет 3—5% или 12—16% от количества исходного АТР в зависимости от избытка ЦМЭ-карбодимид по отношению к нуклеотиду в реакционной смеси. Вещество с таким же положением на хроматограмме образуется и в отсутствие анилина. В настоящей работе оно специально не исследовалось. Возможно, что это соединение представляет N-нуклеотидил-ЦМЭ-мочевину, имеющую дополнительный положительный заряд за счет β-(4-метилморфолиний)этильного радикала.

Основной продукт реакции содержится во фракциях, соответствующих пику 4. Эти фракции объединяли и упаривали для удаления триэтиламонийбикарбоната.

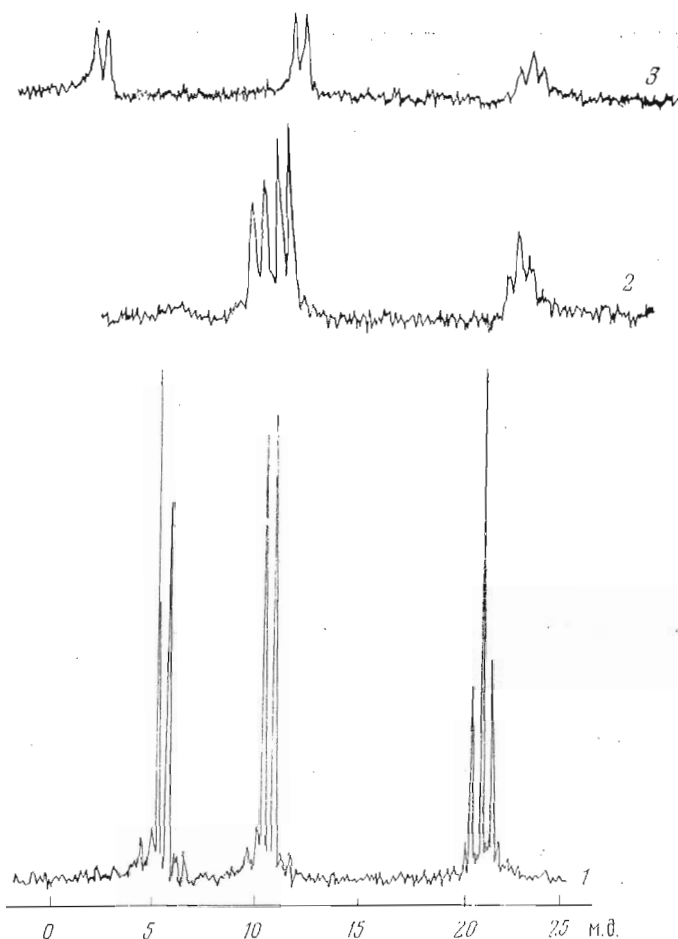


Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР и химические сдвиги соединений в водном растворе при pH 11: 1 — спектр АТР, м. д.: $^{31}\text{P}_\gamma$ — 5,5; $^{31}\text{P}_\alpha$ — 10,6; $^{31}\text{P}_\beta$ — 21,0; 2 — спектр анилида АТР, м. д.: $^{31}\text{P}_\gamma$ — 10,2; $^{31}\text{P}_\alpha$ — 11,4; $^{31}\text{P}_\beta$ — 23,2; 3 — спектр бензиламида АТР, м. д.: $^{31}\text{P}_\gamma$ — 2,5; $^{31}\text{P}_\alpha$ — 11,6; $^{31}\text{P}_\beta$ — 23,0

Полученное вещество оказалось индивидуальным по данным БХ в системах А и Б. Продукты кислотного гидролиза этого соединения были проанализированы путем БХ. В результате было продемонстрировано образование двух соединений примерно в эквивалентных количествах. Одно из них соответствует по УФ-спектру и подвижности при БХ исходному АТР, второе — анилину, количество которого определяли по нингидриновой реакции.

УФ-спектр анилида, приведенный на рис. 2 (спектр 2), в области выше 250 нм аналогичен спектрам адениновых нуклеотидов (рис. 2, спектр 1) в тех же условиях и отличается от них незначительным сдвигом максимума в длинноволновую область ($\lambda_{\text{макс}}$ 262 нм).

Кроме того, в его спектре имеется дополнительный максимум ($\lambda_{\text{макс}}$ 235 нм), близкий к максимуму поглощения анилина. Эти данные позволяют идентифицировать полученное соединение как анилид АТР.

В спектре ^{31}P -ЯМР анилида (рис. 3, спектр 2) наблюдается два дублета и один триплет с отношением площадей 1 : 1 : 1. Константы спин-спинового расщепления равны 20 Гц для α - и 22,5 Гц для γ -атома фосфора.

Спектральные характеристики при pH 10 и R_f полученных амидов

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм	R_f в системе	
			А	Б
γ -Анилад АТР	235,262	225,247	0,47	0,20
γ -Анилад dАТР	235,262	226,246	0,45	0,25
γ -Анилад УТР	234,264	225,247	0,45	0,12
γ -Анилад GТР	234,264	228,247	0,32	0,06
Бензиламид АТР	262	238	0,43	0,25
Циклогексиламид АТР	260	234	0,50	0,20
Морфолид АТР	260	234	0,40	0,16

По сравнению с АТР (рис. 3, спектр 1) наиболее смещен первый дублет, соответствующий γ -атому Р. У этого дублета также несколько увеличена константа спин-спинового расщепления. В спектре ^{31}P -ЯМР продукта реакции АТР с бензиламидом, полученного аналогичным образом (рис. 3, спектр 3), также наиболее сдвинут дублет, соответствующий γ -атому фосфора. УФ-спектр этого продукта (рис. 2, спектр 3) аналогичен спектру АТР. Это позволяет обоим синтезированным соединениям приписать структуру γ -амидов АТР.

Аналогично анилиду и бензиламиду АТР были получены морфолид и циклогексиламид АТР, а также амиды некоторых других рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

Спектральные характеристики $\lambda_{\text{макс}}$ и $\lambda_{\text{мин}}$ и подвижности полученных соединений при БХ приведены в таблице. По аналогии с вышеописанными данными этим соединениям также приписано строение γ -амидов нуклеозид-5'-трифосфатов.

Все полученные амиды АТР устойчивы в нейтральной и щелочной средах, а в кислой — гидролизуются до соответствующих исходных нуклеозид-5'-трифосфатов.

Экспериментальная часть

n-Толуолсульфонат N-циклогексил-N'- β -(4-метилморфолиний)этил карбодиимида (ЦМЭ-карбодиимид) синтезирован по методике работы [6].

Аденозин-5'-трифосфат натриевая соль, уридин-5'-трифосфат натриевая соль, гуанозин-5'-трифосфат натриевая соль — препараты фирмы «Reanal» (Венгрия). Дезоксиаденозин-5'-трифосфат натриевая соль — препарат производства Научно-исследовательского сектора Новосибирского государственного университета. Амины — анилин, бензиламин, морфолин, циклогексиламин — марки «ч. д. а.», перегнанные. ДЕАЕ-целлюлоза — препарат, полученный на опытной установке НИОХ СО АН СССР.

Кислотный гидролиз амидов для количественного определения амина проводили в 1 н. HCl в течение 2 ч при 40°. Содержание амина в гидролизате определяли при помощи 0,4%-ного нингидрина в ацетоне [7].

Для определения R_f и доказательства индивидуальности синтезированных продуктов использовали нисходящую хроматографию на бумаге FN-12 в системах растворителей: этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3, pH 7,5 (А); изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б).

УФ-спектры снимали на автоматическом регистрирующем спектрофотометре «Spectrum» UV-VIS (ГДР) при pH 10 и концентрации $0,75 \cdot 10^{-4}$ М по нуклеотидному материалу.

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на спектрометре НХ-90 с Фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (фирма «Bruker-Physik AG», ФРГ) при частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% H_3PO_4 (внешний стандарт). Спектры снимали с гетероядерным давлением спин-спиновой связи ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$. Диаметр ампулы — 10 мм,

объем реакционной смеси — 1,5 мл, концентрация ^{31}P во всех экспериментах — 0,15 М. Количественную обработку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей по всему спектру.

Получение γ -анилида АТР. Реакцию проводили в термостатированной кювете при 11°. 6 мкмоль аденозин-5'-трифосфата растворяли в 2 мл воды, рН раствора доводили до 5,6. При непрерывном перемешивании реакционной смеси добавляли 120 мкмоль ЦМЭ-карбодиимида. Постоянное значение рН (контроль с помощью потенциометра ЛПУ-01) поддерживали добавлением 0,5 н. HCl. Через 30 мин защелачивание реакционной смеси прекращалось, и в этот момент добавляли 0,3 мл анилина (3 ммоль). Реакционную смесь разбавляли водой, доводя концентрацию солей до 0,05—0,1 М, и наносили на колонку (25×1,2 см) с DEAE-целлюлозой в бикарбонатной форме. Элюцию проводили, используя линейный градиент концентраций 0,01—0,3 М ТЭАБ, рН 7,5 (по 500 мл). Скорость элюции — 30 мл/ч, объем фракций — 5 мл. Фракции, содержащие нуклеотидный материал, объединяли и упаривали при 30°. Выход каждого продукта определяли, исходя из числа ОЕ (при 259 нм), соответствующего каждому пику. Выход анилида (пик 4) — 85—90%.

Аналогичным способом были получены и другие амиды (см. таблицу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шестаков В. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Биохимия, 29, 300—305.
2. Шестаков В. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Вестн. МГУ, сер. «Химия», № 4, 81—84.
3. Necht S. M., Nozarich J. W. (1973) Biochim. et biophys. acta, 331, 307—309.
4. Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г. (1973) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 14, 74—80.
5. Бабкина Г. Т., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кнорре Д. Г., Ковригина В. С. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, 68—72.
6. Кнорре Д. Г., Шубина Т. Н. (1960) Кинетика и катализ, 1, 519—524.
7. Зайцева Т. Н., Тюленева Н. П. (1959) Лабор. дело, 3, 24—28.

Поступила в редакцию
11.XI.1974

PREPARATION OF γ -AMIDES OF NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES IN AQUEOUS SOLUTION WITH WATER SOLUBLE CARBODIIMIDE

BABKINA G. T., ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The reactive derivatives of nucleoside 5'-phosphates, formed by the reaction of nucleoside 5'-phosphate with water soluble carbodiimide, were shown to interact rapidly and nearly quantitatively with amines, giving rise to the corresponding amides. By this reaction, ATP, dATP, UTP and GTP anilides, as well as ATP benzylamide and morpholide were prepared. For the latter two compounds it was demonstrated that γ -atom P participates in the phosphamide bond formation.