



УДК 547.963 : 547.857 : 547.466 : 543.422.25

СИНТЕЗ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ γ -АМИДОВ
АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ **Зарытова В. Ф., Кюрре Д. Г., Курбатов В. А.,
Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Разработан метод синтеза алкилирующих реагентов — производных γ -амидов АТР (III) — путем взаимодействия аденозин-5'-триметафосфата (I) с замещенными бензиламинами, содержащими ароматическую 2-хлорэтиламиногруппу (II), в смеси DMSO с метанолом. Структуры синтезированных аналогов АТР (III) доказаны совокупностью химических методов и метода ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{31}P . 4-[N-2-Хлорэтил-N-метиламино]-бензил- γ -амид АТР (IIIa) в слабощелочной среде алкилирует лизин, ацетат и этилендиамин. Константа скорости лимитирующей стадии (образование катиона этиленаммония) $4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ при 40° .

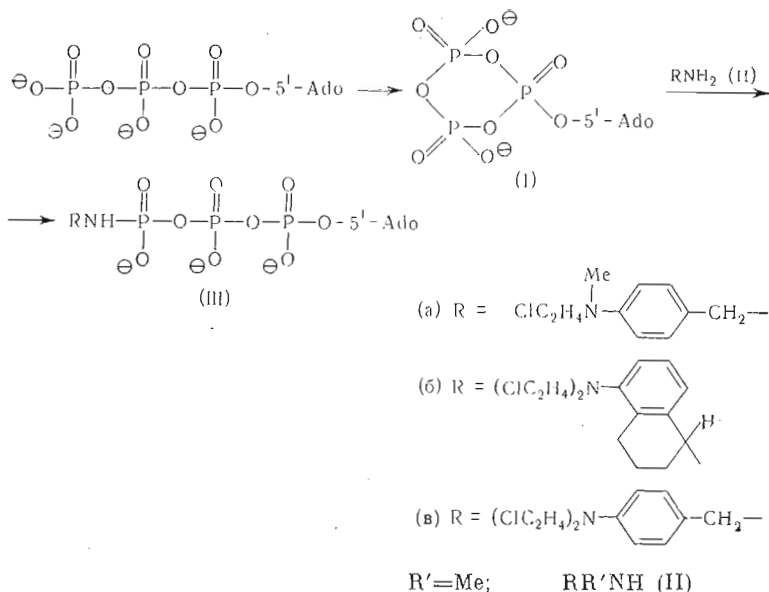
Недавно показано, что γ -анилиды АТР являются конкурентными ингибиторами некоторых АТР-зависимых ферментов [1, 2]. Представлялось интересным синтезировать γ -амиды АТР — аналоги этого важнейшего метаболита — с алкилирующей функциональной группой в остатке амина с тем, чтобы использовать эти соединения в качестве афинных модификаторов ферментов.

В настоящей работе осуществлен синтез нескольких алкилирующих γ -амидов АТР (III), являющихся производными диаминов с 2-хлорэтильными остатками в ароматической аминогруппе (реакционная способность таких диаминов в реакциях алкилирования была исследована в нашей лаборатории ранее [3]), и изучены реакции алкилирования лизина, уксусной кислоты и этилендиамина одним из синтезированных аналогов АТР.

Ранее некоторые γ -амиды АТР были получены при действии DCC на смесь АТР с аминами [4, 5]. Недостатком этого метода является низкий выход фосфамида вследствие торможения кислотнo-каталитической активации АТР в присутствии амина и образования большого количества побочных продуктов [5]. Недавно для получения γ -амидов АТР предложено использовать активное фосфорилирующее производное, образующееся при действии на АТР водорастворимого карбодимида [6].

Однако для нашей цели при работе с лабильными и плохо растворимыми в присутствии воды ароматическими 2-хлорэтиламинами такой метод также оказался непригодным.

* Сокращения: DCC — дициклогексилкарбодимид; DMSO — диметилсульфоксид; МКХ — микроколоночная хроматография.



В связи с этим в качестве метода активации АТФ мы выбрали реакцию с DCC в неводной среде, приводящую, как показано в работе [7], к образованию аденозин-5'-триметафосфата (I). Нам удалось добиться количественного протекания реакций активации АТФ и фосфорилирования амина без образования побочных продуктов в результате проведения этих двух стадий при различной кислотности среды в разных растворителях, отличающихся по сольватирующей способности.

При обработке 3—5-кратным избытком DCC в DMSO АТФ быстро и количественно превращается в активированное производное, что легко наблюдать по изменению спектра ³¹P-ЯМР реакционной смеси (рис. 1, а, б). Через 1 ч мультиплет при 24 м. д. (рис. 1, б) оказывается единственным регистрируемым сигналом. Его положение позволяет заключить, что образовалась структура с ангидридными атомами фосфора (I).

Аденозин-5'-триметафосфат (I) в среде DMSO устойчив и сохраняется по крайней мере в течение суток. По данным работы [7], в пиридине это соединение неустойчиво.

Предварительные эксперименты по фосфорилированию алифатических аминов (этилендиамина, 1,5-диамино-1,2,3,4-тетрагидронафталина) при помощи триметафосфата (I) в среде DMSO показали, что эта реакция протекает быстрее при добавлении растворителей, хорошо сольватирующих анионы (вода, метанол). Поэтому синтез γ-амидов АТФ (III) мы проводили путем прибавления метанольных растворов аминов (II) к раствору (I) в DMSO. Строение синтезированных соединений доказано совокупностью химических методов и метода спектроскопии ЯМР на ядрах ³¹P.

**Химические сдвиги атомов фосфора в АТФ и γ-амидах АТФ
в различных растворителях**

| Соединение | ρ ^α | ρ ^β | ρ ^γ | Растворитель |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|
| АТФ | 12,7 | 23,6 | 11,2 | DMSO |
| АТФ | 11,7 | 23,9 | 10,9 | DMSO — метанол (1 : 1) |
| γ-Амид (IIIа) | 11,6 | 21,4 | 2,2 | » |
| АТФ | 11,8 | 24,0 | 10,6 | DMSO — пиридин (1 : 1) |
| γ-Амид (IIIб) | 11,6 | 21,6 | 3,6 | » |
| АТФ | 11,4 | 23,1 | 10,8 | DMSO — вода (1 : 1) |
| 2-Аминоэтил-γ-амид АТФ | 11,2 | 21,2 | 1,8 | » |

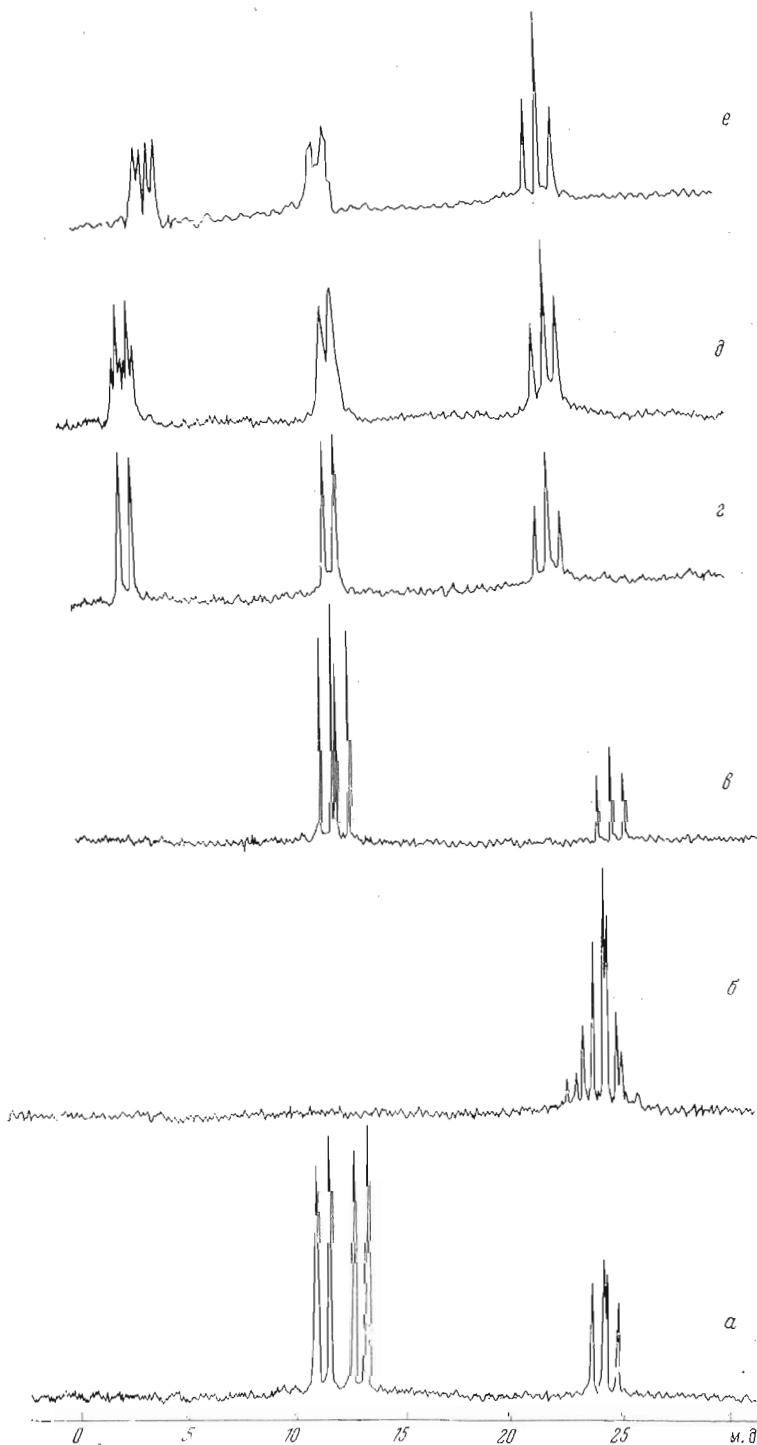


Рис. 1. Спектр ^{31}P -ЯМР: *a* — раствора АТФ в DMSO (0,1 М); *б* — реакционной смеси через 1 ч после добавления DCC в концентрации 0,3 М к 0,1 М раствору АТФ в DMSO; *в* — 0,1 М раствора АТФ в смеси DMSO — метанол (1 : 1); *г* — раствора 0,05 М (I) и 0,15 М (IIa) в смеси DMSO — метанол (1 : 1) через 2 ч после смешения (с подавлением гетероядерного спин-спинового взаимодействия $\{^1\text{H}\}\text{-}^{31}\text{P}$); *д* — той же реакционной смеси (без подавления взаимодействия $\{^1\text{H}\}\text{-}^{31}\text{P}$); *е* — раствора 0,05 М (I) и 0,3 М (IIб) в смеси DMSO — пиридин (1 : 1) через 40 мин после смешения. Спектр записан без подавления спин-спинового взаимодействия $\{^1\text{H}\}\text{-}^{31}\text{P}$

Спектры ЯМР соединений (III), записанные непосредственно в реакционной смеси по окончании реакции с подавлением гетероядерного спин-спинового взаимодействия $\{^1\text{H}\}-^{31}\text{P}$, отличаются от спектров АТР в тех же растворителях смещением сигнала γ -фосфата на 7--8 м. д. в слабое поле (см. таблицу и рис. 1, *в, з*). В то же время в спектрах аналогов (III), записанных без подавления гетероядерного спин-спинового взаимодействия $\{^1\text{H}\}-^{31}\text{P}$, наблюдаются характерные расщепления сигналов γ -фосфора, обусловленные взаимодействием этого атома фосфора с протонами при ближайшем атоме углерода. Характер этих расщеплений зависит от числа протонов, и спектр соединения оказывается в этом случае зависящим от структуры остатка амина. Так, соединения (IIIа) и (IIIб) имеют соответственно 2 и 1 протон при атоме углерода, ближайшем к γ -атому фосфора. В связи с

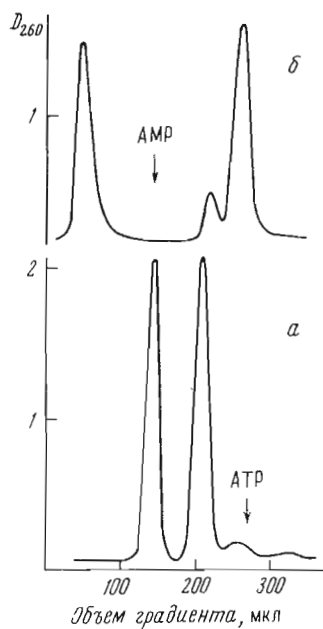


Рис. 2

Рис. 2. Профили МНХ реакционной смеси алкилирования этилендиамина соединением (IIIа) в течение 30 мин (*а*) и кислотного гидролизата той же реакционной смеси после 2 ч алкилирования (*б*). Стрелками указаны положения в профиле АТР и АМР

этим мультиплет γ -фосфора в спектре соединения (IIIа) имеет вид дублета триплетов (рис. 1, *д*), а в спектре (IIIб) — дублета дублетов (рис. 1, *е*). Наблюдается также расщепление сигнала α -фосфора на протонах 5'- CH_2 -группы рибозы (рис. 1, *д, е*).

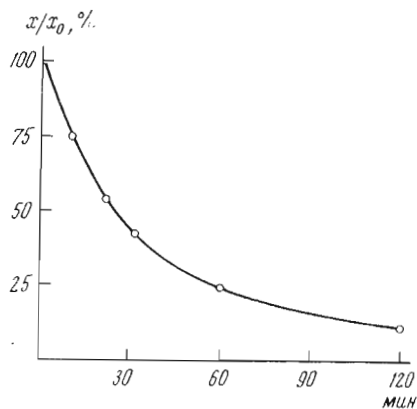


Рис. 3

Рис. 3. Кинетическая кривая расходования соединения (IIIа) при алкилировании 0,05 М этилендиамина при 40° (рН 8) в присутствии 0,02 М MgCl_2

Аналоги АТР (III) выделены в виде натриевых солей осаждением безводным ацетатом натрия из раствора в абсолютном метаноле. Использование этих соединений в качестве реагентов для алкилирования аминокислот и карбоксильных группировок изучено нами на примерах взаимодействия амида (IIIа) с ^{14}C -лизинном, ^{14}C -ацетатом натрия и этилендиамином; во всех этих реакциях были получены с высокими выходами продукты алкилирования.

Алкилирующий γ -амид АТР (IIIа) практически количественно расходуется в реакции с этилендиамином. Продукт алкилирования идентифицирован по положению в профиле МНХ (рис. 2, *а*). Его кислотный гидролиз приводит к эквимолярной смеси АТР и производного амина (рис. 2, *б*).

Количественное образование продукта алкилирования этилендиамина позволяет по данным о скорости расходования амида (IIIа) на образование продукта алкилирования оценить константу скорости лимитирующей ста-

дии отщепления иона хлора [3]. Эта величина, вычисленная по данным, приведенным на рис. 3, равна $4 \cdot 10^{-1} \text{с}^{-1}$, что по существу совпадает с соответствующей величиной для уридил- $(5'-N)$ -4-[N -2-хлорэтил- N -метил-амино]бензиламина [8] и в 4 раза выше аналогичного параметра для исходного амиа (II а) [3].

Экспериментальная часть

В работе использовали АТР производства фирмы «Reanal» (Венгрия). Содержание основного вещества не менее 95%.

Ионный хлор определяли потенциометрическим титрованием 0,1 М раствором азотнокислого серебра. Содержание общего хлора определяли после гидролиза ковалентно связанного хлора в 0,9 М NaOH при 100° в течение 1 ч.

Хроматографию проводили на бумаге ватман ЗММ в системе этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3), pH 7,5.

Синтезированные соединения анализировали методом МКХ на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,5) [9]. Контрольные опыты по разделению смеси АТР, ADP и AMP показали возможность сокращения продолжительности анализа продуктов реакции этим методом до 10 мин.

Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P записывали на спектрометре НХ-90 с Фурье-преобразователем на ЭВМ В-НС 12 («Brucker-Physic AG») на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приводили относительно H_3PO_4 как внешнего стандарта. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 2 мл. Количественную оценку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегралов по всему спектру. Точность интегрирования 10%.

Триэтиламмониевая соль АТР. Раствор 400 мг динатриевой соли АТР в 0,01 М бикарбонате триэтиламмония (pH8) пропускали через 10 мл смолы амберлит IRC-50 в триэтиламмониевой форме, упаривали с добавлением *n*-бутанола при 30° и осаждали из *n*-бутанола эфиром. Выход 800 мг триэтиламмониевой соли АТР. Найдено 96% основного вещества (по интегральным кривым спектра ^{31}P -ЯМР) и 95% (по данным МКХ).

Аденозин-5'-триметафосфат (I). Определение полноты активации АТР. Триэтиламмониевую соль АТР (140 мг, 0,16 ммоль) растворяли в 1,5 мл DMSO, высушивали упариванием с пиридином (0,2 мл) и добавляли 100 мг DCC. Через 1 ч записывали спектр ^{31}P -ЯМР (рис. 1, б, 100% основного продукта от содержания АТР). 0,02 мл реакционной смеси вливали в 0,2 мл 1 М раствора этилендиамина (pH 8) и через 10 мин разбавляли водой до 20 мл. 0,05 мл полученного раствора подвергали МКХ. Найдено, %: 2-аминоэтил- γ -амида АТР — 95, ADP — 4, АТР — 1.

Получение оснований аминов (II). К охлажденному до 5° раствору 240 мг дихлоргидрата (IIб) [10] (т. пл. $205\text{--}207^\circ$) в 2 мл метанола прибавляли охлажденные до 5° 4М раствор аммиака в абсолютном метаноле (1 мл) и диоксан (7 мл). Выпавший осадок хлористого аммония быстро удаляли центрифугированием при 0° . Метанол и диоксан упаривали при пониженном давлении на холоду. Масло растворяли в метаноле (0,4 мл) и немедленно использовали в реакции с амином (I).

Аналогично получали основания аминов (IIа) и (IIв) из дихлоргидрата (IIа) (т. пл. $192\text{--}195^\circ$) и дихлоргидрата (IIв) [11] (т. пл. $165\text{--}170^\circ$). Диоксан в этих случаях заменяли эфиром.

γ -Амиды АТР (III). Раствор 0,02 ммоль (I) в 0,2 мл DMSO вливали в раствор 0,22 ммоль (II) в 0,1 мл абс. метанола. Через 40 мин при 20° продукт осаждали эфиром (4 мл), промывали эфиром, растворяли в 0,5 мл метанола и прибавляли 40 мг безводного ацетата натрия. Выход натриевой соли (III) 8 мг.

Гидролиз соединений (III) при pH 1 в течение 1 ч при 40° приводит к эквимольной смеси АТР и амина (II), идентифицированных по положению в профиле ионообменной хроматографии, УФ-спектрам и R_f при БХ.

γ -Амид (IIIa). $\epsilon_{240}/\epsilon_{280}$ 0,47, найдено: содержание γ -амида; (IIIa) — 98% (МКХ); АТР—1,05 мкмоль/мг; ионный хлор — 0,0; ковалентный хлор — 0,93 мкмоль/мг.

γ -Амид (IIIб). Найдено: содержание γ -амида (МКХ) — 94%; АТР—1,0 мкмоль/мг; ионный хлор — 0,0; ковалентный хлор — 1,8 мкмоль/мг.

γ -Амид (IIIв). Найдено: содержание γ -амида (МКХ) — 80%; АТР — 0,8 мкмоль/мг; ионный хлор — 0,1; ковалентный хлор — 1,3 мкмоль/мг.

Реакции алкилирования γ -амидом (IIIa). а) Раствор 1 мкмоль (IIIa) в 1 мл 0,9 М ^{14}C -ацетата натрия с удельной активностью 7500 имп/мин·мкмоль при pH 8 выдерживали 2 ч при 40°. Продукт отделяли от избытка ацетата на колонке с сефадексом G10 (15 мл). Фракции с 5 по 10 мл собирали, упаривали до 0,1 мл. 0,05 мл хроматографировали на бумаге. Основной УФ-поглощающий продукт имел R_f 0,4 (выход 70%). Обнаружены следовые количества веществ с R_f 0,1 и 0,3 и не полностью отделившегося при гель-фильтрации ацетата (R_f 0,7). Основным продуктом гидролизовали 0,1 М HCl при 40° в течение 1 ч и рехроматографировали. Найдено: АТР. ^{14}C -уксусная кислота, амин с R_f 0,05; 0,7; 0,9 в количестве 0,35; 0,3; 0,3 мкмоль. б) Раствор 1 мкмоль (IIIa) в 0,1 мл 0,065 М ^{14}C -лизина с удельной радиоактивностью $5 \cdot 10^5$ имп/мин·мкмоль при pH 9 в присутствии 0,05 М MgCl₂ выдерживали 2 ч при 40°. 10 мкл раствора хроматографировали на бумаге. Основное УФ-поглощающее вещество имеет R_f 0,1 (выход 75%). Найдено, мкмоль: ^{14}C -лизина — 0,085, АТР (после кислотного гидролиза) — 0,075. Параллельно алиquotу реакционной смеси анализировали методом МКХ. Найдено, мкмоль: продукта алкилирования — 0,75 (по радиоактивности, в пересчете на 0,1 мл смеси) и 0,7 (по оптической плотности); АТР — 0,1; амида (IIIa) — 0,2.

в) Раствор 0,3 мкмоль (IIIa) в 0,1 мл 0,05 М этилендиамина, 0,02 М MgCl₂ при pH 8 выдерживали при 40°. Отбираемые через определенное время алиquotы реакционной смеси (0,01 мл) разбавляли в 10 раз и пробу в 10 мкл подвергали МКХ. Степень превращения (IIIa) в продукт алкилирования оценивали по соотношению высот пиков на хроматограмме (рис. 2, а и 3). Продолжительность анализа при 20° 10 мин.

Авторы признательны Т. С. Ломакиной за помощь в выполнении эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабкина Г. Т., Кнорре В. Л., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И. (1974) Докл. АН СССР, 216, 1165—1167.
2. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A., Terlova N. M. (1974) FEBS Lett., 49, 159—172.
3. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1974) Докл. АН СССР, 201, 609—611.
4. Verheyden D. L. M., Wehrli W. E., Moffatt J. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1253—1254.
5. Шестаков В. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», № 4, 81—84.
6. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) Биоорган. химия, 1, 611—615.
7. Glonek T., Kleps R. A., Myers T. C. (1974) Science, 185, 352—355.
8. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1970) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 14, вып. 6, 110—116.
9. Грачев М. А. (1973) В кн. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, ред. Кнорре Д. Г. и Венкстерн Т. В., 104—122, «Наука», М.
10. Шишкин Г. В., Мамаев В. П., Латушкина Р. М. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 6, 1404—1405.
11. Bergel F., Everett J. L., Roberts J. J., Ross W. C. J. (1955) J. Chem., Soc., 3835—3839.

Поступила в редакцию
24.1.1975

SYNTHESIS OF ALKYLATING DERIVATIVES
OF ATP γ -PHOSPHORAMIDATES

ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G., KURBATOV V. A., LEBEDEV A. V.,
SAMUKOV V. V., SHISHKIN G. V.

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

A method is proposed for the synthesis of a new group of alkylating reagents, the derivatives of ATP γ -phosphoramidates (III). The method involves adenosine 5'-trimetaphosphate reaction with 2-chloroethylamino derivatives of benzylamines in DMSO-methanol mixture. The structures of the ATP analogs (III) were proved by means of NMR- ^{31}P spectroscopy as well as by chemical methods. In weakly alkaline aqueous medium, ATP γ -{4-[N-2-chloroethyl-N-methylamino]-benzylphosphoramidate} alkylates lysine, acetic acid and ethylene diamine. For the rate-limiting step, ethylene immonium ion formation, the rate constant was found to be $4 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (at 40°).
