



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ P^1 , P^3 -БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТРИФОСФАТА,
 P^1 , P^1 -БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТЕТРАФОСФАТА
И ЕГО ФОСФОНАТНОГО АНАЛОГА С ПОМОЩЬЮ
КАРБОНИЛПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ*

Тарусова Н. Б., Осипова Т. И., Пурыгин П. П.*,
Якимова И. А.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

*Куйбышевский государственный университет

P^1 , P^1 -бис(5'-аденозил)тетрафосфат (Ar_4A) и P^1 , P^3 -бис(5'-аденозил)трифосфат (Ar_3A) синтезированы из ADP в одну стадию при помощи карбонилдитриазола или карбонилдобензимидазола. Эти реагенты, а также карбонилди-[4(5)-бромимидазол] удобны для синтеза фосфонатного аналога Ar_4A , $Arr[CH_2]ppA$.

Динуклеозидолигофосфаты, P^1 , P^3 -бис(5'-аденозил)трифосфат (Ar_3A), P^1 , P^1 -бис(5'-аденозил)тетрафосфат (Ar_4A) и P^1 , P^1 -бис(5'-гуанозил)тетрафосфат обнаружены сравнительно недавно в бактериях и клетках млекопитающих [2, 3]. На основании возрастающего количества экспериментальных данных, в частности об изменениях в концентрации этих нуклеотидов при метаболических перестройках в клетках, им приписывается роль клеточных регуляторов [4, 5]. Механизм действия этих нуклеотидов неизвестен, хотя данные о связывании Ar_4A с белком, ассоциированным с ДНК-полимеразой из клеток HeLa [6], представляют некоторые перспективы для раскрытия таких механизмов. Обнаружено ингибиторное действие Ar_4A по отношению к ряду ферментов, например ADP-рибозополимеразе [7], тирозинкиназам вирусов [8], концевой нуклеотидилтрансферазе [9].

Ar_3A и Ar_4A синтезируются некоторыми аминоксил-тРНК-синтетазами [10, 11], в то же время предполагается участие специфических клеточных гидролаз в регулировании уровня этих нуклеотидов в клетках [12].

Для изучения биосинтеза и роли Ar_4A было предложено несколько типов фосфонатных аналогов Ar_4A [1, 13]. Один из этих аналогов удовлетворительно имитировал структуру Ar_4A и ингибировал его синтез лизиновой тРНК-синтетазой [14].

Известные ранее методы получения Ar_3A и Ar_4A заключались во взаимодействии избытка морфолида AMP с ортофосфатом (в случае Ar_3A), пирофосфатом (в случае Ar_4A) [15] или АТР [16] в абс. пиридине. Описан также одностадийный синтез Ar_4A из ADP с дициклогексилкарбодимидом в водном пиридине [13]. При этом Ar_3A и Ar_4A были в смеси с АТР и другими, близкими к ним по хроматографической подвижности продуктами реакции, что затрудняло выделение нуклеотидов в чистом виде.

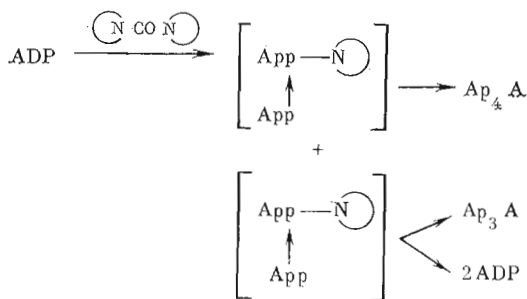
В синтезе Ar_4A и его аналога такие широко применяемые реагенты, как карбонилдимидазол, не давали удовлетворительных результатов; образовывалась сложная смесь веществ, выходы продуктов были нестабильными. Это вызвало необходимость поиска более мягких реагентов, которые обеспечивали бы возможность получения этих нуклеотидов в препаративных количествах. В этом отношении представляло интерес иссле-

* См. сообщение [1]. Сокращения: КДТ — карбонилди-(1,2,4)-триазол, КДБ — карбонилдобензимидазол, КДБИ — карбонилди-[4(5)-бромимидазол], DMF — диметилформамид.

довать в качестве активирующих реагентов некоторые карбонильные производные азотсодержащих гетероциклов [17], в которых остатки гетероциклов обладали бы более кислыми свойствами, чем имидазол, и, вероятно, оказались бы более легко уходящими группами. Реакционная способность этих соединений мало изучена, и сделаны только первые шаги в их применении при синтезе олигофосфатов нуклеозидов [18] и их фосфонатных аналогов.

Ранее нами уже был использован карбонилдитриазол (КДТ) для синтеза фосфонатного аналога СТР и была отмечена способность КДТ димеризовать фосфаты и фосфонаты нуклеозидов [1]. На этом основании мы предположили возможность димеризации ADP под действием КДТ, которая приводила бы к образованию Ar_4A . Было обнаружено, что при добавлении КДТ к раствору ADP в DMF такая реакция действительно протекала. После анионообменной хроматографии были выделены три соединения: ADP, Ar_4A и Ar_3A . Суммарный выход Ar_3A и Ar_4A , считая на ADP, взятый в реакцию, составлял ~35% (при примерно равных количествах Ar_3A и Ar_4A в смеси) и ~70%, считая на прореагировавший ADP. Лучшие результаты получены с карбонилддобензимидазолом. Хотя время реакции было более продолжительным, выходы нуклеотидов были стабильными и составляли ~40 и 80% соответственно на исходный и прореагировавший ADP. Следует отметить низкое содержание примесей веществ, близких по зарядам к Ar_3A и Ar_4A , в реакционной смеси, простоту их отделения и, таким образом, возможность выделения хорошо очищенных нуклеотидов при однократной хроматографии. Подобные реакции могут быть использованы для получения меченых соединений.

Одно из предположений об образовании Ar_3A в таких синтезах заключается в том, что активированный ADP, по-видимому, может реагировать как с концевым (β -), так и с соседним (α -) остатками фосфорильных групп второй молекулы ADP, как показано на схеме. Можно предположить, что нестабильный промежуточный продукт при гидролизе распадается по двум путям, давая Ar_3A и ADP.



N — остатки 1,2,4-триазола или бензимидазола

Не исключено, что подобные превращения нуклеозид-5'-олигофосфатов могут протекать и при ферментативных реакциях, например при взаимодействии АТР с аминокислотами, которое катализируется аминокислот-тРНК-синтетазами. Вместе с тем, по данным исследований для фенилаланиновых тРНК-синтетаз из *E. coli* и дрожжей, продуктом непосредственного взаимодействия АТР с аминокислотами является Ar_4A ; Ar_3A представляет собой вторичный продукт, возникающий в результате расщепления Ar_4A до ADP и последующей реакции ADP с аминокислотами [10, 11].

В синтезе аналога Ar_4A , $\text{App}[\text{CH}_2]\text{ppA}$ были также применены КДТ и КДБ и, кроме того, новый реагент — карбонилди-[4(5)-бромимидазол] [19]. Остаток гетероцикла в этом соединении также является очень сла-

Синтез нуклеотидов с применением карбонильных производных азотсодержащих гетероциклов

Продукты синтеза	Реагенты COX ₂ , где X	Время реакций *, ч		Выход, %	
		активации	конденсации	Продукты синтеза	Примеси, близкие по зарядам к продуктам
Ar ₄ A	1,2,4-Триазол	—	12	16	3—4
Ar ₃ A	Бензимидазол	—	48	20	
Ar ₄ A				21	1—2
Ar ₃ A				20	
App[CH ₂]ppA	1,2,4-Триазол	3	12	16	15
»	Бензимидазол	24	100	36	2
»	4(5)-Бромимидазол	24	120	17	1—2
»	Имидазол [13]	12	12	5—40	30

* Оптимальное время реакций устанавливалось на основании анализа состава реакционной смеси при помощи ТСХ на силикагеле и PEI-целлюлозе.

бым основанием. Синтез App[CH₂]ppA проводили по аналогии с реакцией, описанной в работе [13], где использовалась имидазольная активация; изменяли только активирующий реагент и время реакции в соответствии с химической реакционной способностью реагентов. Время отдельных стадий реакций, выход продуктов и примесей с близкой к продуктам хроматографической подвижностью приведены в таблице. Наиболее удовлетворительными реагентами оказались КДБИ и КДБ, особенно последний, обеспечивающий более высокий выход метиленового аналога Ar₄A.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что класс производных азотсодержащих гетероциклов перспективен для поиска эффективных реагентов для синтеза динуклеозидолигофосфатов и их фосфонатных аналогов.

Экспериментальная часть

В работе были использованы AMP, ADP (Reanal, ВНР), DEAE-целлюлоза DE-32 (Whatman, Англия). Ar₄A, как образец для сравнения, синтезирован по методу [13]. Карбонилдитриазол, карбонилдибензимидазол и карбонилди-[4(5)-бромимидазол] синтезированы по методикам [17, 19]. ADP для синтеза был очищен от примесей AMP ионообменной хроматографией на DE-32.

Для ТСХ использовали пластинки силуфол UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) и пластинки с PEI-целлюлозой (Merck, ФРГ). Системы для ТСХ: на силикагеле — iPrOH — 25% NH₄OH — H₂O, 7:1:2; на PEI-целлюлозе — 1 M LiCl и 0,25 M фосфатный буфер (pH 8).

При определении выходов нуклеотидов по УФ-поглощению и их оптической чистоты (составлявшей 97—99%) были использованы известные значения коэффициентов молярной экстинкции для Ar₃A и Ar₄A [2] и для App[CH₂]ppA [13].

Отсутствие примесей, содержащих фосфор, в препаратах нуклеотидов контролировали с помощью ³¹P-ЯМР-спектров, снятых на спектрометре XL-100-15 (Varian, США). Рабочая частота 100 МГц, внешний стандарт — H₃PO₄. Спектры снимались при шумовом подавлении сигналов протонов. Для Ar₄A спектр описан в работе [13], для Ar₃A (δ, м.д.): —10,38 д (P¹, P³); —22,2 т (P²); J_{P1P2} 19 Гц.

Синтез Ar₄A и Ar₃A. 470 мг (1 ммоль) ди-Na-соли ADP превращали в дитрибутиламмонийную соль. К раствору ADP в 15 мл абс. DMF добавляли 820 мг (5 ммоль) КДТ или 1020 мг (4 ммоль) КДБ, перемешивали при 20°С (время реакций указано в таблице). Растворы разбавляли до 500 мл водой (pH 7,5), хроматографию проводили на колонке с DE-32 (4,5×40 см, HCO₃⁻-форма) в градиенте концентрации 0,1—0,6 M NH₄HCO₃ (5 л.). Фракции, содержащие ADP, Ar₃A и Ar₄A, упаривали в вакууме при 30°С, 3—4 раза упаривали со спиртом и водой для обессоливания.

В опытах с КДТ выделили ADP, Ar_3A и Ar_4A — 210, 80 и 72 мг. Выходы Ar_3A и Ar_4A , считая на взятый в реакцию (в скобках — на прореагировавший ADP), соответственно 20 мг (35%) и 16 мг (29%). В опытах с КДБ получили ADP, Ar_3A и Ar_4A — 230, 94 и 93 мг, для Ar_3A и Ar_4A выходы составляли 20 мг (39%) и 21 мг (39%) соответственно.

Синтез $App[CH_2]ppA$. Общая методика. К раствору 1 ммоль метилendioфосфоновой кислоты [13] в форме дитрибутиламмонийной соли в 20 мл DMF добавляли 10 ммоль КДБ, КДТ или КДБИ. Время реакций активации указано в таблице. Затем добавляли 0,4 мл абс. MeOH и через 30 мин (в случае КДТ) или через 3 ч (для КДБ и КДБИ) приливали раствор 4 ммоль трибутиламмонийной соли AMP в 15 мл DMF. Смесь перемешивали при 20° С (время реакции указано в таблице). Разделение продуктов реакций проводили в условиях, приведенных в предыдущей методике. Выходы $App[CH_2]ppA$ на метилendioфосфоновую кислоту приведены в таблице, там же даны количества примесей, близких по хроматографической подвижности к $App[CH_2]ppA$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусова Н. Б., Осипова Т. И., Завгородний С. Г. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 802–807.
2. Holler E., Holmquist B., Vallee B. L., Taneja K., Zamecnik P. C. Biochemistry, 1983, v. 22, № 21, p. 4924–4933.
3. Floodgaard H., Klenov H. Biochem. J., 1982, v. 208, № 3, p. 737–742.
4. Lennan A. G., Prescott M. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 3, p. 1609–1619.
5. Denisenko O. N. FEBS Lett., 1984, v. 178, № 1, p. 149–152.
6. Rapoport E., Zamecnik P. C., Baril E. F. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 23, p. 12148–12151.
7. Tanaka J., Matsunami N., Jochihara K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 99, № 3, p. 837–843.
8. Barnekov A. Biosci. Reports, 1983, v. 3, № 2, p. 153–162.
9. Ono K., Iwata J., Nakamura H., Matsukage A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 34–40.
10. Plateau P., Mayaux J. F., Blanquet S. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4654–4662.
11. Goerlich O., Foekler R., Holler E. Eur. J. Biochem., 1982, v. 126, № 1, p. 135–142.
12. Ogilvie A., Antl W. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 7, p. 4105–4109.
13. Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. М. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 838–843.
14. Бирюков А. И., Шумянцева В. В. Тез. докл. на 8 Объединенном Симпозиуме биохимических обществ СССР — ГДР. Рига, 1985, с. 56–57.
15. Adam A., Moffatt J. G. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 4, p. 838–842.
16. Grummt F. Proc. Nat. Amer. Soc., 1978, v. 75, № 1, p. 371–375.
17. Birkofer L., Richter P., Ritter A. Chem. Ber., 1960, B. 93, № 6, S. 2804–2809.
18. Папчихин А. В., Пuryгин П. П. В кн.: Строение и свойства молекул. Куйбышев, 1983, с. 110–115.
19. Пuryгин П. П., Колодкина И. И., Конькова Е. П., Юркевич А. М. Хим.-фармацевт. журн., 1983, № 10, с. 1235–1237.

Поступила в редакцию
17.VI.1985

После доработки
31.VII.1985

THE SYNTHESIS OF P^1, P^3 -BIS(5'-ADENOSYL)TRIPHOSPHATE, P^1, P^4 -BIS(5'-ADENOSYL)TETRAPHOSPHATE AND ITS PHOSPHONATE ANALOGUE WITH THE USE OF CARBONYL DERIVATIVES OF NITROGEN-CONTAINING HETEROCYCLES

TARUSOVA N. B., OSIPOVA T. I., PURYGIN P. P.,
YAKIMOVA I. A.*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow, * Kujbyshev State University, Kujbyshev

P^1, P^4 -bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap_4A) and P^1, P^3 -bis(5'-adenosyl)triphosphate (Ap_3A) have been obtained in the onepot procedure with the use of carbonyldi-(1,2,4-triazole) or carbonyldibenzimidazole. These compounds as well as carbonyldi-[4(5)-bromoimidazole] are convenient reagents for the preparation of the Ap_4A phosphonate analogue, $App[CH_2]_2ppA$.