



УДК 547.963.32.057

СИНТЕЗ НОВОГО АНАЛОГА ADP— α,β -ИМИДО-ADP

Шумянцева В. В., Смирт Н.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
* Институт органической химии и биохимии Академии наук ЧССР, Прага

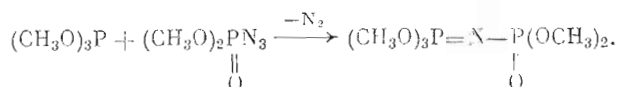
Предложен метод синтеза неизвестного ранее аналога ADP — α,β -ими́до-ADP. Метод основан на реакции окислительного иминирования аденозин-5'-фосфата и диметиллового эфира фосфоазиды с последующим гидролизом промежуточного фосфоазо-соединения. Ими́до-ADP охарактеризован методами ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии и данными ферментативного гидролиза.

Моделирование P—O—P-звена в пирофосфате и нуклеозидполифосфатах широко применяется для получения аналогов, используемых в биологических исследованиях. Описаны аналоги пирофосфата с заменой кислорода на углерод, азот [1], серу [2]. Наиболее сходны по структурным параметрам P—NH—P- и P—O—P-фрагменты. Валентные углы и межатомные расстояния составляют соответственно 127,2 (P—NH—P) и 128,6° (P—O—P) и 1,68 и 1,63 Å [1]. Кроме того, особенность P—NH—P-фрагмента заключается в том, что для некоторых ферментов структуры с P—N-связью являются субстратами. Так, неорганическая пирофосфатаза *E. coli* расщепляет ими́додифосфат [3], а щелочная фосфатаза *E. coli* расщепляет связь P—N в β,γ -ими́доаналоге АТФ [4]. β,γ -Ими́доаналог АТФ испытан во многих других ферментативных реакциях.

α,β -Ими́доаналоги нуклеозидполифосфатов не описаны, несмотря на интерес, который эти структуры могут представлять в связи с изучением ряда полимераз и нуклеозиддифосфокиназ [5].

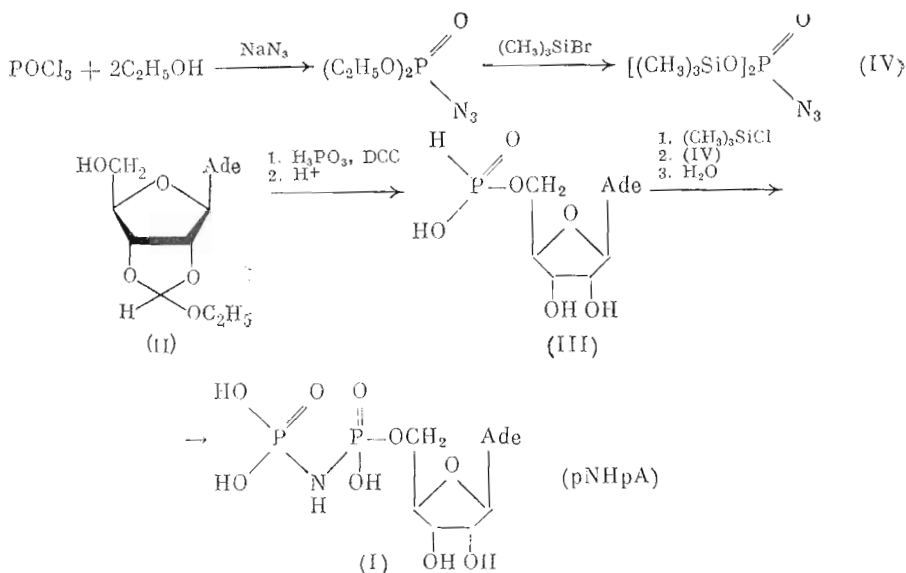
Наши попытки получить α,β -ими́доаналог ADP (pNHpA) конденсацией ими́додифосфата с защищенными по гидроксильным группам нуклеозидами в присутствии дидциклогексилкарбодиими́да (DCC) или триэтилопропилбензолсульфохлорида (TIBS) не привели к продуктам фосфорилирования даже в присутствии такого нуклеофильного катализатора, как N,N-диметиламинопиридин. DCC и TIBS не активируют ими́додифосфат. Это может быть связано с особенностями строения ими́додифосфата: протон ими́ногруппы перераспределен между двумя PO_3^{2-} -группами. Длина связи P—N в ими́додифосфате короче, чем в $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{NH}_2$, что свидетельствует о частичной двосвязанности в P—NH—P-триаде.

Одной из реакций, приводящих к созданию P—NH—P-фрагмента, является реакция окислительного иминирования, заключающаяся во взаимодействии диалкилфосфоазиды с производными трехкоординационного фосфора, в частности с триалкилфосфитами [6]:



Для синтеза α,β -ими́доаналога ADP (I) мы разработали следующую схему синтеза:

Использованы следующие сокращения: DCC — N,N'-дидциклогексилкарбодиими́д; TIBS — 2,4,5-триэтилопропилбензолсульфохлорид; pNHpA — α,β -ими́додифосфоаденозин; ФДЭ — фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1); ФМЭ — щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1).



Нуклеозид-5'-фосфиты могут быть получены несколькими способами: в результате конденсации соответствующим образом защищенных нуклеозидов со смешанным ангидридом, образующимся из бензилфосфита и дифенилфосфата; при взаимодействии нуклеозидов с триэфирами фосфористой кислоты в условиях кислого катализа с последующим гидролизом эфирных групп; при конденсации дезоксинуклеозидов с фосфористой кислотой в присутствии конденсирующих агентов [7]. Для синтеза аденозин-5'-фосфита (III) мы проводили конденсацию 2',3'-этоксиметиленаденозина (II) с фосфористой кислотой в присутствии DCC.

После снятия защитных групп (80% CH_3COOH , 50° С, 30 мин) и препаративной хроматографии на DEAE-целлюлозе в линейном градиенте триэтиламонийбикарбонатного буфера фосфит (III) получен с выходом 85%.

Как известно, реакция окислительного иминирования протекает лишь с триэфирами фосфористой кислоты, для которых характерно наличие электронной пары, локализованной на трехкоординационном атоме фосфора. Поэтому нуклеозид-5'-фосфит превращали сначала в соответствующий диметилселиловый эфир с одновременной защитой 2'- и 3'-ОН-групп [7]. Соответственно диэтилфосфоазид, полученный по [6], превращали в бис(триметилсилил)фосфоазид (IV) с выходом 30% обработкой последнего избытком триметилбромсилана в течение 2 сут (его строение подтверждено данными ^1H -ЯМР и элементного анализа).

Реакцию окислительного иминирования проводили 2–3 сут при эквимолярном соотношении фосфоазид (IV) и нуклеозид-5'-фосфита (III) в тетрагидрофуране или пиридине при комнатной температуре. Основной побочный продукт этой реакции — аденозин-5'-фосфат, который возникает в результате окисления соответствующего фосфита и образование которого удается предотвратить проведением реакции в атмосфере аргона.

Затем реакционную смесь обрабатывали 0,2 М ТЕАВ для гидролиза силиловых эфиров. Выходы имидодифосфата в тетрагидрофуране и пиридине составляют соответственно 25 и 22%. Строение целевого продукта (I) подтверждено данными ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР.

Было изучено отношение имидодифосфата (I) к фосфодиэстеразе змеяного яда и щелочной фосфатазе *E. coli*. Первый из ферментов не гидролизует (I), что согласуется с данными работ [4, 8, 9] по действию фосфодиэстеразы на β, γ -имидоаналоги АТФ и GTP — расщепления связи $\text{P}-\text{NH}-\text{P}$ не происходит. Действие же щелочной фосфатазы приводит по нашим данным к образованию аденозина и амида АМР; по данным работы [8] β, γ -имидо-АТФ гидролизует до амида ADP, в то же время по данным работы [9] β, γ -имидо-GTP — до гуанозина.

В работе [10] изучено комплексообразование ионов металлов, которые являются активаторами многих энзиматических реакций, с β , γ -имидоаналогом АТР. Оказалось, что ион металла взаимодействует со свободными атомами кислорода β -фосфата и с атомом азота между атомами фосфора, т. е. атом азота вовлечен в комплексообразование. По-видимому, для α , β -имидо-ADP можно ожидать такого же взаимодействия.

Таким образом, предложенный путь синтеза сделал доступным аналог ADP, в котором дифосфатная цепь, включающая атом азота, имеет большее геометрическое сходство с природным ADP. Возможность вовлечения атома азота в комплекс с ионами металлов должна отразиться на субстратных свойствах α , β -имидо-ADP.

Экспериментальная часть

В работе использованы аденозин (Reanal, ВНР), фосфодиэстераза змеиного яда и щелочная фосфатаза (Worthington, США), Chellex-100 (Bio-Rad, США), DEAE-целлюлоза (Whatman, Англия), пластинки для ТСХ Silufol UV₂₃₄ (ЧССР), пластинки с полиэтиленминцеллюлозой (Merck, ФРГ).

Системы для ТСХ: изопропанол – аммиак – вода, 7:1:2 (А); 1 М LiCl (Б); изопропанол – аммиак – вода, 6:2:2 (В).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spexord (ГДР), ЯМР-спектры – на приборе Varian-100-15 (США), ³¹P-ЯМР-спектры снимали при шумовом подавлении протонов, перед снятием спектров следы металлов удаляли из образцов с помощью Chellex-100. Все химические сдвиги (δ) в ¹H-ЯМР-спектрах в миллионных долях относительно тетраметилсилана, а в ³¹P-ЯМР-спектрах – относительно 85% H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта.

Аденозин-5'-фосфит (III). Фосфористую кислоту (492 мг, 6 ммоль) сушили двукратным упариванием с абс. пиридином, растворяли в 30 мл пиридина, добавляли этоксиметиленаденозин (II) (975 мл, 3 ммоль), перемешивали до растворения и добавляли N,N'-дициклогексилкарбодимид (1,3 г, 6 ммоль) и инкубировали 2 сут при перемешивании при 20°С. Дициклогексилмочевину удаляли фильтрацией и раствор упаривали досуха. Ортоэфирную защиту снимали 50% CH₃COOH (30 мин, 50°С). Раствор упаривали, вновь перепаривали с водой досуха, растворяли в воде и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Хроматографию проводили в линейном градиенте концентрации ТЕАВ (0–0,4 М, 4 л), фракции, выходящие при 0,25 М концентрации буфера, упаривали, вновь упаривали с этанолом. Выход 78% (1,12 г); R_f 0,6 (А), λ_{\max} 260 нм, ϵ_{\max} 15 300; ¹H-ЯМР (D₂O): 6,66д (1H, P–H, J 630 Гц), 6,03д (1H, H1', J 5 Гц), 8,12с (1H, H2), 8,43с (1H, H8).

Бис(триметилсилил)фосфоазид (IV). К 4,75 г (0,026 моль) диэтилфосфоазид, полученного по методике [6], прибавляли 9,1 мл (0,07 моль) триметилбромсилана, нагревали 3 ч при 60°С, оставляли при 20°С на 2 сут. После перегонки в вакууме получен фосфоазид (IV) с выходом 30%, т. кип. 65–66°С/1 мм рт. ст. Найдено, %: С 27,70; Н 6,34; N 16,70. C₆H₁₈O₃N₃PSi₂. Вычислено, %: С 28,0; Н 6,75; N 15,78. d 1,02; ¹H-ЯМР (CDCl₃, δ , м. д.): 0,34 с; ³¹P-ЯМР (CDCl₃): –18,53.

α , β -Имидодифосфоаденозин (I). Триэтиламониевую соль (III) (1,6 г, 3,9 ммоль) трижды упаривали с абс. пиридином (по 20 мл), растворяли в 50 мл абс. пиридина, добавляли триэтиламин (2,8 мл, 19,5 ммоль) и триметилхлорсилан (2,5 мл, 19,5 ммоль) и выдерживали 15 мин при 20°С. Затем добавляли бис(триметилсилил)фосфоазид (IV) (1,068 г, 4 ммоль) и выдерживали 3 сут при 20°С. Осадок хлоргидрата триэтилamina удаляли фильтрованием, к реакционной смеси добавляли 30 мл 0,2 М ТЕАВ для гидролиза сильных производных. Через 30 мин смесь упаривали, растворяли в воде, наносили на колонку (37×50 мм) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма) и хроматографировали в линейном градиенте бикарбоната аммония (0–0,3 М, 4 л). Имидодифосфоаденозин содержался во фракциях, соответствующих 0,26–0,27 М буфера. Буферный раствор удаляли многократным упариванием с водой и этанолом. Выход 25% (446 мг, 0,97 ммоль), R_f 0,084 (А), 0,27 (В). ¹H-ЯМР (D₂O): 8,46с (H8), 8,14с (H2), 6,01д (H1', J 5 Гц); ³¹P-ЯМР: –0,58д (P^a), 0,84д (P^b), J_{PNP} 5 Гц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yount R. G. // Science. 1969. V. 166. P. 1510–1511.
2. Loewsu D. I., Eckstein F. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 10. P. 3287–3292.
3. Smirnova I. N., Baykov A. A., Awaeva S. M. // FEBS Letters. 1986. V. 206. № 1. P. 121–124.
4. Yount R. G. // Adv. Enzymol. 1975. V. 43. P. 1–56.
5. Yokoyama M., Uesaka H., Ohtsuki K. // FEBS Letters. 1986. V. 206. № 2. P. 287–291.
6. Кабачник М. И., Гуляров В. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1961. № 5. С. 819–823.
7. Chen J., Benkovic S. J. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 11. P. 3737–3753.
8. Yount R. G., Babcock D., Ballantyne W., Ojala D. // Biochemistry. 1971. V. 10. № 13. P. 2484–2489.

9. *Eckstein F., Kettler M., Parmeggianti A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1971. V. 45. № 5. P. 1151–1158.
10. *Tran-Dink S., Roux M.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 76. № 1. P. 245–249.

Поступила в редакцию
4.III.1987

SYNTHESIS OF A NEW ANALOGUE OF ADP, α,β -IMIDO ADP

SHUMYANTZEVA V. V., SMRT I.*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

** Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak
Academy of Sciences, Prague*

α,β -Imido analogue of ADP has been synthesized and characterized by ^1H and ^{31}P NMR spectra and by enzymatic degradation.