



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ АМР
И СТЕРИЧЕСКИ ЗАТРУДНЕННЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ
КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ*Третьякова С. С., Соколова П. И., Ризник В. М.,
Петушикова Е. В., Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Изучены реакции нуклеофильного замещения устойчивых в воде смешанных ангидридов АМР и 2-метил-, 2-нитро-, 2,4,6-трибром-, 2,4,6-триэтилбензойной кислот (соединения (I)–(IV) соответственно). Показано, что соединения (I) и (II) являются ацилирующими, а (III) и (IV) – фосфорилирующими агентами. Обнаружена зависимость скорости фосфорилирования от основности и структуры карбоновой кислоты, входящей в состав смешанного ангидрида. Проведено сравнительное изучение ингибирующего действия соединений (I), (III) (IV) и (MsCO)₂рА на Са-АТР-азу тяжелого меромиозина. Соединение (III) оказалось наиболее эффективным необратимым, а соединение (IV) – обратимым ингибитором.

Как было показано нами ранее [1], смешанные ангидриды нуклеотидов и мезитиленкарбоновой кислоты в отличие от других ацилфосфатов в реакциях с нуклеофильными реагентами проявляют не ацилирующие, а фосфорилирующие свойства. На этой аномальной реакционной способности основано применение смешанных ангидридов АМР, АДР и АТР с мезитиленкарбоновой кислотой в качестве аналогов субстратов и ингибиторов для аффинного мечения АТР-зависимых ферментов [2, 3]. Продолжение изучения смешанных ангидридов нуклеотидов и ряда стерически затрудненных ароматических карбоновых кислот вызвано их успешным практическим использованием в ряде лабораторий. Прежде всего важно

Таблица 1

Выходы и некоторые характеристики смешанных ангидридов (I)–(IV)

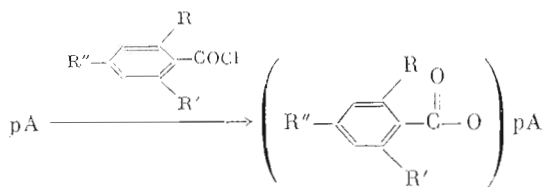
Соединение	Выход	R_f^*	E_{AMR}	УФ-спектр	
				λ_{max}	λ_{min}
(I)	95	0,75	0,50	248	222
(II)	70	0,72	0,48	258	234
(III)	80	0,75	0,42	260	245
(IV)	90	0,80	0,47	256	235

* БХ.

было выявить зависимость между структурой таких смешанных ангидридов и направлением их реакций с нуклеофильными агентами.

В настоящей работе осуществлен синтез смешанных ангидридов АМР и ряда стерически затрудненных ароматических кислот, изучены их реакции с нуклеофильными реагентами, определена устойчивость в водных растворах, а также способность ингибировать АТР-азную активность тяжелого меромиозина.

Смешанные ангидриды АМР и ароматических карбоновых кислот получали с использованием метода, описанного в работе [1] (схема)



- (I) R=CH₃, R'=R''=H;
 (II) R=NO₂, R'=R''=H;
 (III) R=R'=R''=Br;
 (IV) R=R'=R''=C₂H₅.

Соединения (I)–(IV) выделяли методом препаративной бумажной хроматографии (табл. 1).

Поскольку ранее было обнаружено, что фосфодиэстераза змеиного яда гидролизует смешанные ангидриды нуклеотидов и мезитиленкарбоновой кислоты (MsCOOH) [1], этот фермент был использован для анализа структуры полученных соединений. В гидролизатах всех четырех соединений обнаружили АМР и соответствующую ароматическую кислоту в соотношениях, близких эквивалентным. Следовательно, смешанные ангидриды нуклеотидов и карбоновых кислот независимо от структуры кислотного остатка наряду с фосфодиэфирами и пирофосфатами служат субстратами для фосфодиэстеразы змеиного яда.

Так как в смешанных ангидридах (I)–(IV) карбонильный атом углерода экранирован заместителями ароматического кольца, можно было ожидать, что нуклеофильная атака будет направлена на атом фосфора. Однако в реакциях с аминами соединения (I) и (II) оказались исключительно ацилирующими, а не фосфорилирующими агентами. При взаимодействии смешанных ангидридов (I) и (II) с *n*-бутиламином образуются бутиламиды 2-метилбензойной (V) и 2-нитробензойной (VI) кислот соответственно. Их строение доказано сравнением с образцами, полученными встречным синтезом из хлорангидридов кислот и *n*-бутиламина.

Смешанные ангидриды (III) и (IV) в реакциях с нуклеофильными реагентами, как и (MsCO)pA, проявляли фосфорилирующие свойства. 2,4,6-Трибромбензойная и мезитиленкарбоновая кислоты являются структурными аналогами, но значительно различаются по основности (рК 1,41 и 4,42 соответственно) [4]. Поэтому, как и следовало ожидать, смешанный ангидрид (III) взаимодействовал с нуклеофильными агентами более эффективно, чем (MsCO)pA. Так, при реакции с бутиламином соединение (III) за 1 ч количественно превращалось в (BuNH)pA. За то же время превращение (MsCO)pA проходило лишь на 60%.

Реакция соединения (III) с анилином в пиридине завершалась через 3 ч. При этом наряду с (PhNH)pA (выход 50%) из реакционной смеси был выделен АМР и симметричный 5'-пирофосфат аденозина. Эти побочные продукты, очевидно, явились результатом гидролиза и фосфорилиза исходного соединения. При выдерживании (MsCO)pA с анилином в пиридине за 3 ч образования (PhNH)pA не наблюдается.

Таблица 2

Сравнительное изучение реакций соединения (IV) и (MsCO)pA с аминами

Исходное соединение	Амин	Время реакции, ч	Выход, %	
			фосфоамид	АМР
(IV)	NH ₃	24	66,6	33,4
(MsCO)pA	»	24	82,4	17,6
(IV)	BuNH ₂	20	59,4	40,6
(MsCO)pA	»	20	72,5	27,5
(IV)	PhNH ₂	120	20,5	79,5
(MsCO)pA	»	120	66,4	33,6

Таблица 3

Сравнение ингибирующего действия смешанных ангидридов (I), (III), (IV) и (MsCO)pA

Смешанный ангидрид	K_i^* , М	K_i' , М	Время полуминимакт-ивации **, мин
(MsCO)pA	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$	66
(I)	$1,5 \cdot 10^{-5}$		
(III)	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	60
(IV)	$4 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-1}$	100

* K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса в случае обратимого конкурентного торможения; K_i' — константа диссоциации для первой стадии образования фермент-ингибиторного комплекса в случае необратимого торможения.

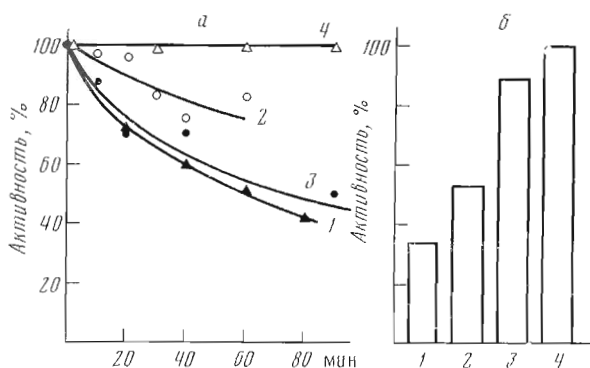
** При концентрации ингибитора 1 мМ.

Реакция соединения (III) с этанолом в присутствии пиридина завершилась через 20 ч. Из реакционной смеси был выделен (Et)pA (70%), АМР и симметричный 5'-широфосфат аденозина. В этих же условиях (MsCO)pA с этанолом взаимодействовал лишь на 20%.

Соединение (IV) в реакциях с аммиаком, бутиламино и анилином оказалось менее реакционноспособным, чем (MsCO)pA. При этом для обоих соединений ((IV) и (MsCO)pA) в качестве побочной реакции наблюдался гидролиз с образованием АМР. Согласно табл. 2, чем меньше стерическая затрудненность используемого амина, тем меньше различия в выходах соответствующих фосфоамидов. Вероятно, основной причиной, снижающей эффективность фосфорилирования соединением (IV) по сравнению с (MsCO)pA, является наличие более объемных заместителей в остатке 2,4,6-триэтилбензойной кислоты.

Полученные смешанные ангидриды (I)–(IV), как и описанный ранее (MsCO)pA [1], довольно устойчивы в воде. Так, периоды полураспада соединений (I)–(III) (рН 7,6; 37°С) составили соответственно 14, 4 и 1 сут. Соединение (IV) в этих условиях за 14 сут гидролизовалось лишь на 30%. Столь высокая устойчивость в воде позволила использовать соединения (I), (III) и (IV) в качестве ингибиторов АТР-азы тяжелого меромиозина.

Ранее нами было установлено, что (MsCO)pA по сравнению с (MsCO)ppA и (MsCO)pppA является наиболее эффективным ингибитором Са-АТР-азной активности миозина и его фрагмента — тяжелого меромиозина [5]. Была обнаружена зависимость торможения ферментативной активности АТР-азы от концентрации ингибитора. При концентрациях (MsCO)pA 0,01–0,1 мМ наблюдалось сильное обратимое конкурентное торможение ферментативной активности, которое возникало в первые же



Ингибирование Са-АТФ-азы тяжелого меромыозина смешанными ангидридами (III) (1), (IV) (2) и (MsCO)pA (3). 4 — без ингибитора: а — необратимое ингибирование при концентрации ингибиторов 1,1 мМ; б — обратимое ингибирование при концентрации ингибиторов 0,1 мМ

секунды контакта белка с ингибитором и не развивалось во времени. При повышении концентрации ингибитора до 0,4–3 мМ наряду с обратимым наблюдалось необратимое торможение [5].

Как известно, АМР даже в высоких концентрациях не оказывает конкурентного ингибирующего действия на Са-АТФ-азную активность миозина. Было высказано предположение, что высокое сродство (MsCO)pA к миозину связано с наличием гидрофобного остатка мезитиленкарбоновой кислоты [5]. В связи с этими данными представлялось целесообразным изучить ингибирующее действие соединений (I), (III) и (IV), отличающихся от (MsCO)pA структурой ароматического радикала. Константы обратимого и необратимого торможения, рассчитанные с использованием методов, приведенных в работах [6, 7], показывают, что соединение (I) является весьма эффективным конкурентным обратимым ингибитором (табл. 3). Но оно не вызывало необратимого ингибирования, что, вероятно, связано с отсутствием у него фосфорилирующей способности.

Соединение (III) по необратимому ингибирующему действию мало отличается от (MsCO)pA (рисунок, а), хотя его сродство к ферменту несколько выше (табл. 3). Неожиданным оказалось слабое действие соединения (III) в качестве обратимого конкурентного ингибитора (рисунок, б, табл. 3).

Соединение (IV), наоборот, характеризуется большей эффективностью в качестве обратимого конкурентного ингибитора: его K_i на порядок меньше, чем K_i (MsCO)pA. В то же время оно является слабым необратимым ингибитором (рисунок, а). Вероятно, сближение фосфатного остатка смешанного ангидрида (IV) и модифицируемой нуклеофильной группы активного центра фермента пространственно затруднено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность действия исследованных ингибиторов в случае обратимого конкурентного торможения АТФ-азной активности увеличивается при «усилении» их гидрофобных свойств (K_i (IV) < K_i (MsCO)pA < K_i (I) < K_i (III)). При необратимом торможении АТФ-азной активности наблюдается следующая закономерность: чем большей фосфорилирующей способностью и меньшей гидрофобностью обладает смешанный ангидрид, тем выше его эффективность ингибирования (K_i (III) < K_i (MsCO)pA < K_i (IV)).

Экспериментальная часть

Хроматографию проводили на бумаге FN-1 (БХ) в смеси этанол — 1 М ацетат аммония, рН 7,5 (7 : 3), и на пластинках «Силуфол» (ТСХ) в этиловом спирте. Вертикальный электрофорез проводили в течение 1,5 ч при

градиенте напряжения 35 В/см на приборе «Labor» (Венгрия) в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (рН 7,5). УФ-спектры снимали в воде и спирте на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР). Коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм принимали равными для рА 15 000, 2-метилбензойной кислоты 600, 2-нитробензойной кислоты 4000, 2,4,6-триэтилбензойной кислоты 1800, 2,4,6-трибромбензойной кислоты 3600. ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (ГДР) в вазелиновом масле.

В работе использовали АМР (Reanal, Венгрия), препараты фосфодиэстеразы змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Wortington, Англия). Ферментативный гидролиз проводили по методике [8].

Синтез соединений (I)–(IV) проводили по стандартной методике [1]. Соединения (II) и (III) выделяли хроматографически при 4° С.

2,4,6-Трибромбензойную кислоту синтезировали из 3-амино-2,4,6-трибромбензойной кислоты по методике [10]. Выход 52%. R_f (ТСХ) 0,85. В ИК-спектре не обнаружены полос в области 3500–3300 см⁻¹ (NH). Найдено, %: С 23,38; Н 0,90; Вг 66,79. С₇Н₃Вг₃О₂. Вычислено, %: С 23,43; Н 0,84; Вг 66,81. 2,4,6-Триэтилбензойную кислоту получали по методике [11].

Хлорангидриды 2-метил-, 2-нитро-, 2,4,6-трибром-, 2,4,6-триэтилбензойной кислот синтезировали по методике [12].

*Реакция соединения (I) с *n*-бутиламином.* К 5 мкмоль смешанного ангидрида (I) прибавляли 500 мкмоль ВuNH₂ в 0,1 мл воды. Смесь выдерживали 18 ч при 37° С, разделяли БХ. Обнаружили АМР (R_f 0,18) и *n*-бутиламид 2-метилбензойной кислоты (V) (R_f 0,95). УФ-спектр последнего в воде (рН 6): $\lambda_{\text{макс}}$ 239, $\lambda_{\text{мин}}$ 215 нм.

Аналогично проводили реакцию соединения (II) с бутиламином. *n*-Бутиламид 2-нитробензойной кислоты R_f 0,95, УФ-спектр в воде (рН 6): $\lambda_{\text{макс}}$ 265, $\lambda_{\text{мин}}$ 236 нм.

Встречный синтез соединений (V) и (VI) проводили, обрабатывая 2 ммоль *n*-бутиламина в 0,5 мл абс. пиридина 0,2 ммоль хлорангидридов 2-метилбензойной или 2-нитробензойной кислот соответственно в течение 15 мин при 20° С. Реакционные смеси разделяли БХ. Хроматографические и спектрофотометрические характеристики соединений (V) и (VI) аналогичны приведенным выше.

*Реакция соединения (III) с *n*-бутиламином и анилином.* К 5 мкмоль смешанного ангидрида (III) прибавляли 50-кратный избыток амина в 0,1 мл воды или пиридина. Реакционные смеси выдерживали при 37° С и через 0,5; 1, 3, 8 и 20 ч отбирали пробы, которые анализировали методом БХ. Со временем наблюдалось постепенное уменьшение в реакционной смеси исходного соединения (III) (R_f 0,75) и накопление (ВuNH)рА (R_f 0,68). При реакции с анилином кроме (PhNH)рА (R_f 0,59) обнаруживали рА (R_f 0,18) и симметричный пиррофосфат рА (R_f 0,24). Реакцию останавливали при полном исчезновении соединения (III) в реакционной смеси.

Реакция соединения (III) с этанолом. Раствор (5 мкмоль) соединения (III) в 0,1 мл смеси этанол–пиридин (1:1) выдерживали при 37° С и анализировали аналогично описанному выше. В пробе, отобранной через 20 ч, отсутствовало соединение (III), обнаружили (Et)рА (R_f 0,68), рА (R_f 0,18) и симметричный пиррофосфат рА (R_f 0,24) в соотношении 7:2:1.

*Реакцию соединения (IV) и (MsCO)рА с NH₃, *n*-бутиламином и анилином* проводили по описанной ранее методике [1] при 37° С. Реакционные смеси анализировали БХ через 2, 4, 6, 8, 20, 24 и 120 ч, как описано выше. Для (NH₂)рА R_f 0,3.

Гидролитическую устойчивость соединений (I)–(IV) определяли в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5, при 37° С. Гидролизаты анализировали БХ через 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 14 сут, как описано выше.

Ингибирование тяжелого меромиозина соединениями (I), (III), (IV). Миозин и тяжелый меромиозин выделяли из мышц крысы по методу [9]. Са-АТФ-азную активность определяли по нарастающему неорганическому

фосфата в среде методом Фиске и Суббарроу [9]. Среда для определения АТР-азной активности содержала буфер 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,01 М СаСl₂, 0,1 М КСl и 3–4 мМ АТР. Для изучения ингибирующего действия смешанные ангидриды (I), (III), (IV) и (MsCO)pA растворяли в буфере, доводили рН до 7,6, затем смешивали с водным раствором тяжелого меромиозина. Концентрация белка составляла 1,7 мг/мл, концентрацию ингибиторов варьировали от 0,01 до 3 мМ. Через определенные промежутки времени из полученной смеси отбирали по 0,1 мл и добавляли в среду (объем 1 мл) для определения АТР-азной активности. В нулевой пробе при изучении только необратимого ингибирования АТР-азную реакцию начинали добавлением 0,1 мл водного раствора тяжелого меромиозина (1,7 мг/мл) в среду инкубации, содержащую ингибитор в соответствующем разведении (0,04–0,3 мМ). Результаты представлены на рисунке.*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A.* Modification of end phosphate groups in mono- and oligonucleotides.— *Nucleic Acids Res.*, 1976, v. 3, t. 3, p. 903–916.
2. *Козлов И. А., Шаламберидзе М. В., Новикова И. Ю., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Смешанные ангидриды нуклеотидов и мезэтиленкарбоповой кислоты — ингибиторы митохондриальной АТР-азы.— *Биохимия*, 1977, т. 42, № 9, с. 1704–1710.
3. *Краусе Р., Ковалева Г. К., Гуляев Н. И., Баранова Л. А., Агаларова М. Б., Северин Е. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Киселев Л. Л.* Ингибирование лейцил-тРНК-синтетаз модифицирующими аналогами АТР.— *Биохимия*, 1978, т. 43, № 4, с. 656–661.
4. *Bunnet J. F., Robinson M. M., Penington F. C.* The action of sodium methoxide on methyl esters.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, v. 72, t. 6, p. 2378–2381.
5. *Петушкова Е. В., Рисник В. М., Соколова Н. И., Третьякова С. С., Шабарова З. А.* Ингибирование Са-АТР-активности тяжелого меромиозина фосфорилирующими аналогами субстрата.— *Биохимия*, 1980, т. 45, № 4, с. 726–732.
6. *Уэбб Л.* Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966, с. 158–159.
7. *Kitz R., Wilson I. B.* Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase.— *J. Biol. Chem.*, 1962, v. 237, № 10, p. 3245–3249.
8. *McCutchan T. F., Gilham P. T.* Studies on polynucleotides containing hybrid sequences. Synthesis of oligonucleotides containing thymidine.— *Biochemistry*, 1973, v. 12, t. 24, p. 4840–4846.
9. *Петушкова Е. В., Власова Т. П.* Влияние концентрации ионов Са²⁺ на кинетику гидролиза АТР миозином.— *Биохимия*, 1974, т. 39, № 6, с. 1278–1284.
10. *Синтезы органических препаратов. Сб. статей. М.: ИЛ, 1958, т. 8, с. 59–62.*
11. *Fuson R. C., Corse J.* The coupling action of the grignard reagent. VI. A new synthesis of hexaalkylbenzils.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1938, v. 60, t. 9, p. 2063–2066.
12. *Синтезы органических препаратов. Сб. статей под ред. Казанского Б. А. М.: ИЛ, 1952, с. 462.*

Поступила в редакцию
28.I.1981

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF MIXED ANHYDRIDES OF AMP AND STERICALLY HINDERED AROMATIC CARBOXYLIC ACIDS

TRETYAKOVA S. S., SOKOLOVA N. I., RISNIK V. M.,
PETUSHKOVA E. V., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

New hydrolytically stable mixed anhydrides of AMP and 2-methyl-, 2-nitro-, 2,4,6-tribromo-, or 2,4,6-triethylbenzoic acids (compounds (I)–(IV), respectively) were synthesized and their reactions with amines, ethyl alcohol and water were studied. In the reactions with nucleophiles, compounds (I) and (II) proved to be the acylating agents, whereas compounds (III) and (IV) phosphorylating ones. The dependence of the phosphorylation rate on the basicity and structure of the carboxylic acid forming a mixed anhydride was revealed. (I), (III), (IV) were compared with (MsCO)pA as inhibitors of Ca-ATPase of heavy meromyosin, whereby (III) acted as the most efficient irreversible inhibitor and (IV) — as reversible inhibitor.