



УДК 547.963.32.057:577.152.64*12.042

ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

XIV*. ГАЛОИДФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ АТФ КАК ИНГИБИТОРЫ Ас-СоА — КАРБОКСИЛАЗЫ

*Вирюков А. И., Тарусова Н. В., Алонтов С. Г.,
Осипова Т. И., Горяченкова Е. В.,
Рабинков А. Г.**

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям
химических соединений, г. Кунава Московской обл.*

Галоидфосфонатные аналоги АТФ — $\text{pp}[\text{SNBr}]_n\text{pA}$ и $\text{p}[\text{SNBr}]_n\text{ppA}$, синтезированные из бромметилendisфосфовой кислоты и производных аденозина, оказались эффективными обратимыми ингибиторами Ас-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.2) из печени крыс (K_i 0,2 мМ). Эффективность новых ингибиторов Ас-СоА-карбоксилазы выше, чем для ряда других аналогов АТФ, в том числе фосфонатных и имидоаналогов. Для Ас-СоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1) из сердца кролика бромфосфонатные аналоги АТФ по ингибиторным свойствам не отличались существенно от других аналогов АТФ.

Одним из ключевых ферментов липогенеза в органах млекопитающих является Ас-СоА-карбоксилаза (КФ 6.4.1.2). Это биотинсодержащий белок, который обладает регуляторными функциями и лимитирует процесс биосинтеза жирных кислот в целом [2]. Отмечена корреляция между степенью ингибирования фермента и уровнем триглицеридов в плазме крови мышцей [3]. Есть данные, что ингибирование Ас-СоА-карбоксилазы — одно из важных звеньев гиполипидемического действия клофибрата и его аналогов [2]. Показана существенная роль этого фермента в синтезе холестерина [4].

Ферментативная реакция, катализируемая Ас-СоА-карбоксилазой имеет сложный механизм (см. схему 1).

Схема 1



Начальная стадия этого процесса (реакция *a*) — активация углекислоты с участием АТФ — сходна с аналогичной в реакциях, катализируемых другими биотинзависимыми карбоксилазами, например пируваткарбоксилазой. Поэтому изучение возможности регулирования ферментативной реакции Ас-СоА-карбоксилазы на этой стадии имеет более общее значение.

В настоящей работе было исследовано ингибирование Ас-СоА-карбоксилазы из печени крыс аналогами АТФ с использованием ряда нуклеозидтрифосфатов, фосфонатных и имидоаналогов АТФ, а также новых галоидфосфонатных аналогов АТФ.

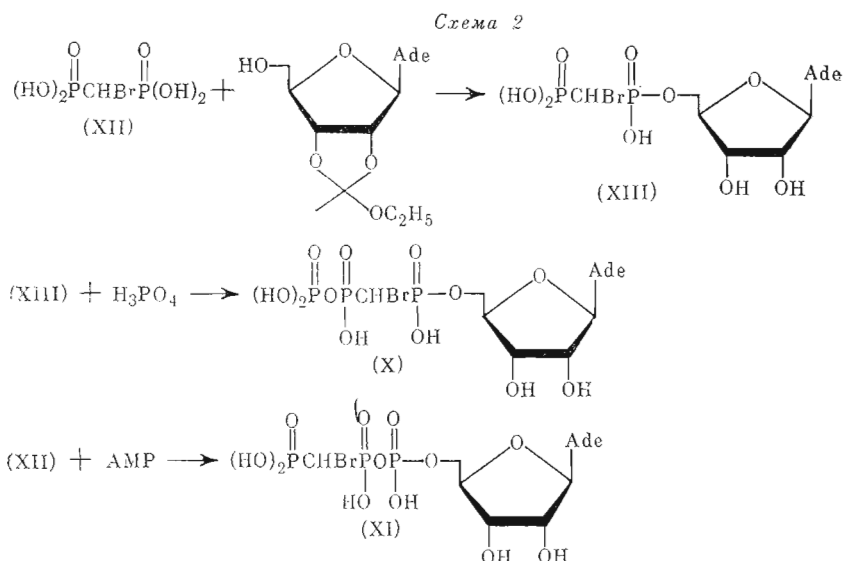
Параллельно проводились испытания того же ряда соединений на Ас-СоА-синтетазе, также модифицирующей CoASAc, но расщепляющей АТФ по другому механизму.

* Сообщение XIII см. [1]. Ас-СоА или CoASAc — ацетил-коазим А, ϵ АТФ — этеноаденозин-5'-трифосфат, CDI — N,N'-карбонилдимидазол, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид.

Нами было исследовано взаимодействие ферментов с нуклеозид-5'-трифосфатами АТР (I), ε АТР (II), ITP (III), GTP (IV), различающимися структурой пуринового основания, с d АТР (V), принадлежащим к дезоксирияду, а также с несколькими аналогами АТР, в которых модифицирована трифосфатная цепочка. Среди них известный аналог АТР, ppp[CH₂O]A (VI), содержащий метиленовую группу между остатком аденозина и P^α [5]. Это соединение стало донором фосфата в ферментативном фосфорилировании уридина, можно ожидать, что оно будет субстратом и других ферментов. Испытаны также стабильные к гидролизу ферментами фосфонатные аналоги АТР [6]: pp[CH₂]pA (VII), p[CH₂]ppA (VIII), имидоаналог p[NH]ppA (IX), а также неизвестные ранее галоидфосфонатные аналоги — pp[CHBr]pA (X) и p[CHBr]ppA (XI), которые были синтезированы в связи с данным исследованием.

Целесообразность использования галоидфосфонатных аналогов нуклеозид-5'-олигофосфатов обоснована в работе [7]. Интерес к таким соединениям объясняется и тем, что некоторые галоидметиленфосфонаты, аналоги пирофосфата, проявляют биологическую активность [8]. Поскольку в соединениях (X) и (XI) объемный атом брома введен во фрагмент, моделирующий расщепляемую ферментом группу, сравнение ингибиторной активности метиленовых аналогов АТР и их бромпроизводных дало бы возможность охарактеризовать влияние крупного электроотрицательного заместителя на свойства трифосфатного фрагмента.

Синтез бромметиленфосфонатных аналогов АТР (X) и (XI) проведен по схеме 2.



Бромметилентетраэтилдифосфонат, синтезированный согласно методике работы [9], после удаления эфирных групп с помощью триметилбромсилана превращался в бромметилендифосфовую кислоту (XII). Соединение (XIII) было получено из кислоты (XII) и 2',3'-защищенного аденозина с DCC по модифицированной нами методике Майерса [10]. Синтезы аналогов АТР (X) и (XI) проведены на основе карбонилдимидазолидного метода, который давал удовлетворительные результаты в случае фосфонатных аналогов АТР [8]. Структура полученных соединений подтверждена ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектрами. Аналоги (X) и (XI) однородны по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, хотя являются смесью диастереомеров. Последнее подтверждено для соединения (X) данными ³¹P-ЯМР-спектров, полученных при пониженной температуре.

Методом двойных обратных величин [12] были получены кинетические константы, характеризующие взаимодействие ферментов с пуриновыми

Взаимодействие Ас-СоА-синтетазы из цитозоля сердечной мышцы кролика и Ас-СоА-карбоксилазы из печени крыс с нуклеозид-5'-трифосфатами и аналогами АТР

Номер соединения	Соединение	Ас-СоА-синтетаза			Ас-СоА-карбоксилаза		
		K_m (каж), мМ	K_i , мМ	V_{max} , отн. ед.	K_m (каж), мМ	K_i , мМ	V_{max} , отн. ед.
(I)	АТР	0,1		1,0	0,2		1,0
(II)	εАТР		1,0			0,4	
(III)	ІТР	5,3		0,2		4,0	
(IV)	GТР		3,5			1,5	
(V)	dАТР	0,5		0,4	0,2		1,2
(VI)	pp[CH ₂ O]pA	1,0		0,2	3,5		0,2
(VII)	pp[CH ₂]pA		0,7			1,5	
(VIII)	p[CH ₂]ppA		1,0			1,2	
(IX)	p[NH]ppA		0,7			2,0	
(X)	pp[CHBr]pA *		0,6			0,2	
(XI)	p[CHBr]ppA *		0,9			0,2	

* Смеси изомеров.

5'-трифосфатами и аналогами АТР в реакциях образования и карбоксилирования СоАS[¹⁴C]Ас.

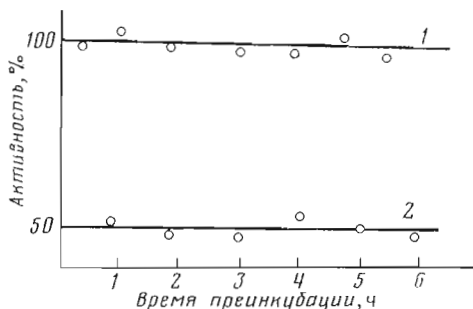
Более широкая специфичность к пуриновым нуклеозид-5'-трифосфатам риборядя наблюдалась в Ас-СоА-синтетазной реакции, где, кроме АТР, субстратные свойства были обнаружены у ІТР (таблица). Из анализа значений K_i для соединений (I) — (IV) следует, что для правильного акцептирования субстрата в случае Ас-СоА-карбоксилазы необходима аминогруппа в положении 6 пурина. Замена ее на карбонильную отрицательно сказывалась на связывании аналогов (III) и (IV). Производное (II), в котором заряд 6-аминогруппы частично сохранен, связывалось с Ас-СоА-карбоксилазой в 2 раза слабее, чем АТР, и утрачивало субстратные свойства.

Отсутствие 2'-ОН-группы в dАТР (V) практически не влияло на его субстратные свойства в отношении Ас-СоА-карбоксилазы. В реакции карбоксилирования СоАS[¹⁴C]Ас величины K_m и V_{max} для АТР и dАТР близки; несколько слабее было действие dАТР как субстрата в реакции ацетилирования СоАSH. Для других ферментов также известны примеры близкой активности по отношению к нуклеотидам дезокси- и риборядя [6, 13]. Такое положение вполне объяснимо, если взаимодействие сахарного остатка с соответствующими участками нуклеотидсвязывающего центра ферментов не является определяющим при узнавании нуклеотидов.

Модификация трифосфатной части АТР в аналогах (VI) — (XI) в той или иной мере приводит к изменению геометрических параметров этого фрагмента молекулы, р K_a групп при атомах фосфора, а также ограничению конформационной подвижности трифосфатного фрагмента [6, 14]. Среди этих соединений только (VI) оказалось субстратом, хотя сродство его к обоим ферментам было довольно низким. Аналоги (VII) — (IX) слабо ингибировали Ас-СоА-синтетазу и Ас-СоА-карбоксилазу. В то же время бромметиленовые аналоги (X) и (XI) независимо от места модификации обладали довольно высоким сродством к Ас-СоА-карбоксилазе. Наблюдаемое ингибирование было конкурентным по отношению к АТР и обратимым. Хотя в модельных опытах с меркаптанами и аминами (данные не показаны) не было обнаружено продуктов их алкилирования бромфосфатными аналогами, тем не менее нельзя было исключить возможность подобной реакции при взаимодействии этих аналогов АТР с ферментами. Мы показали, что ферменты не утрачивали активности после 6 ч преникубации с соединениями (X) и (XI) в концентрациях, вызывающих 50% снижение скорости ферментативной реакции (рисунок). Таким образом, заметный эффект увеличения ингибирования фермента бромфосфонатными аналогами АТР по сравнению с фосфонатными нельзя объяснить необратимым связыванием с Ас-СоА-карбоксилазой.

Повышенное сродство аналога (XI) к Ас-СоА-карбоксилазе по сравнению с соединением (VIII), по-видимому, связано с понижением pK_a его концевой фосфонатной группы до значения, близкого к pK_a этой группы в АТР [14]. Слабое ингибирование метиленовыми аналогами АТР некоторых ферментов [6] объяснялось пониженной конформационной подвижностью трифосфатной цепочки. Хотя введение брома еще больше ограничивает число стабильных ротамеров, высокая активность соединений (X) и (XI) свидетельствует в пользу стабилизации благоприятной для АТР-связывающего участка Ас-СоА-карбоксилазы ориентации отрицательных зарядов в аналогах.

Таким образом, бромметиленфосфонатные аналоги (X) и (XI) являются оптимальными из известных в настоящее время специфических ингибиторов Ас-СоА-карбоксилазы, что открывает определенные перспективы для регулирования биосинтеза жирных кислот *in vivo*.



Влияние длительности преинкубации Ас-СоА-карбоксилазы с бромметиленовым аналогом АТР (XI) на ее активность: 1 — фермент без ингибитора; 2 — фермент в присутствии 0,5 мМ аналога (XI)

Экспериментальная часть

В работе использованы СоАSH и СоАSАс (PL Biochemicals and Calbiochem), нуклеозид-5'-трифосфаты АТР (Reanal, Sigma), dАТР, IТР, GТР, εАТР (Sigma), фосфонатные аналоги АТР, pp[CH₂]pА и p[CH₂]ppА (Serva), имидоаналог АТР, p[NH]ppА (Sigma). Синтез аналога (VI) описан в работе [5]. В опытах применялись трис, дитиотреит, бычий сыrovороточный альбумин, фракция V (Sigma), полиэтиленгликоль-6000 (Merck). Для ВХ и ТСХ использовали DEAE-целлюлозу DE-32 и DE-52 и бумагу Ватман ЗММ (Whatman), пластинки Silufol UV₂₅₄ (Cavalier), Kieselgel F₂₅₄ и пластинки с PEI-целлюлозой F (Merck).

Системы для хроматографии: на силикагеле — Pr'OH — NH₄OH — вода, 7 : 1 : 2 (А); диоксан — NH₄OH — вода, 6 : 1 : 4 (Б); на PEI-целлюлозе — 1 М LiCl (В), на бумаге — насыщенный водой эфир — HCOOH, 7 : 1 (Г).

Удельная активность NaH[¹⁴C]O₃ и [¹⁴C]АсОН (Изотоп) соответственно составляла 520 и 360 МБк/мкмоль. Радиоактивность измеряли на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). Определение белка проводили по методике [15].

УФ-спектры соединений регистрировали на спектрофотометре Spexord UV VIS (ГДР). ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектры сняты на приборе Varian XL-100-15 (США). Химические сдвиги (δ, м.д.) в ¹H-ЯМР-спектрах даны относительно Bu'OH, а в ³¹P-ЯМР-спектрах — относительно (MeO)₃PO как внутренних стандартов.

Бромметилендифосфоновая кислота (XII). Смесь продуктов бромирования этилового эфира метилendifосфоновой кислоты, полученную по методике [7], разделяли на колонке с силикагелем L 100/160. Элюцию проводили смесью хлороформа и ацетона, сначала в отношении 2 : 1, затем — 1 : 1. К 600 мг (1 ммоль) тетраэтилового эфира бромметилендифосфоновой кислоты добавляли 650 мг (4 ммоль) триметилбромсилана, выдерживали раствор 20 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 50 мл абс. эфира, добавляли 20 мл этанола и 0,5 мл анилина, через 1 ч отделяли осадок аниллиновой соли соединения (XII). Выход 325 мг (90%), R_f 0,4 (силикагель, хлороформ — ацетон, 2 : 1). ¹H-ЯМР-спектр: 3,64 (CH, τ, J_{PP} 16 Гц).

Аденозин-5'-[α, β-бромметилен]дифосфат (XIII). К раствору 1,28 г (5 ммоль) соединения (XII) в водном пиридине добавляли 2,4 мл три-*n*-бутиламина, упаривали, сушили упариванием с абс. пиридином, добавляли 0,325 г (1 ммоль) 2',3'-O-этоксиметиленаденозина [16] и 8,20 г DCC,

перемешивали 4 сут при 4° С. Реакционную смесь фильтровали, разбавляли водой до 100 мл и экстрагировали эфиром (15 мл×3), водный слой упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 20 мл 50% уксусной кислоты, нагревали 1 ч при 50° С, упаривали, растворяли в 20 мл 20% муравьиной кислоты, оставляли на 50 ч при 4° С. Раствор упаривали досуха, очистку проводили на дауэксе 50W×8 (H⁺-форма, 200—400 меш, объем 20 мл). Элюировали аналог (XIII) водой, элюаты нейтрализовали NH₄OH, упаривали в вакууме. Выход 245 мг (45%). R_f 0,2 (А). УФ-спектр: λ_{max} 259 нм (ε 15 000). ¹H-ЯМР-спектр: 3,80 (СН, т, J 17 Гц); 6,03 (Н1', д, J 5 Гц); 8,12; 8,48 (Н2, Н8, с).

Аналоги АТР: pp[CHBr]pA (X) и p[CHBr]ppA (XI). К 1 ммоль АМР (в случае синтеза (XI)) или к 1 ммоль (XIII) (для синтеза (X)) в абс. диметилформамиде добавляли 5 ммоль СДИ, перемешивали 12 ч при 4° С, добавляли 0,05 мл метанола и через 30 мин соответственно 5 ммоль соединения (XII) или Н₃РO₄ в форме Вu₃N⁺-соли, перемешивали 24 ч. Разделение реакционной массы проводили на колонках с DEAE-целлюлозой DE-32 (в HCO₃⁻-форме) в градиенте концентраций NH₄HCO₃ от 0,1 до 0,5 М. Выход соединений (X) и (XI) наблюдали при концентрациях NH₄HCO₃ около 0,35 М. Элюаты упаривали и лиофилизовали. Выход продукта (X) 290 мг (46%), R_f 0,1 и 0,1 (А и В). УФ-спектр: λ_{max} 259 нм (ε 15 000). ¹H-ЯМР-спектр: 8,54 (Н8, с); 8,18 (Н2, с); 6,08 (Н1', д, J 5 Гц); 4,05 (СН, т, J 16 Гц). ³¹P-ЯМР-спектр (рН 7, 33° С): 8,32 (А), 8,22 (Б), (Р^α); -1,62 (Р^β, κ); -13,26 (Р', д); J_{Р^αР^β} 4,0; J_{Р^αР'} 25,2. Спектр, снятый при 6° С, подтвердил наличие двух диастереомеров (А и Б), их химические сдвиги для Р^α различались на 0,1 м.д., а для Р^β — менее чем на 0,01 м.д.

Выход аналога (XI) 318 мг (50%), R_f 0,1 (А), 0,15 (В). УФ-спектр: λ_{max} 259 нм (ε 15 000). ¹H-ЯМР-спектр: 8,46 (Н8, с); 8,14 (Н2, с); 6,01 (Н1, д, J 5 Гц); 3,93 (СН, т, J 16 Гц). ³¹P-ЯМР-спектр: -13,76 (Р^α, д); -0,05 (Р^β, κ); 6,50 (Р', д); J_{Р^αР^β} 25,5; J_{Р^βР'} 5,0.

Препараты ферментов. Ас-СоА-синтетазу выделяли из цитозоля сердечной мышцы кролика. Миокард кролика гомогенизировали в 2,5 объема 0,25 М сахарозы, 0,01 М КНСO₃ и 0,001 М EDTA в гомогенизаторе Поттера — Эльвехема. Дифференциальным центрифугированием при 10 000 и 100 000g получали растворимую фракцию, свободную от митохондрий и микросом. Фракцию супернатанта, осаждаемую при 25—40% насыщения (NH₄)₂SO₄, хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 (20×1 см), уравновешенной 0,01 М КНСO₃, содержащим 5 мМ дитиотреит (буфер А). Фермент элюировали в линейном градиенте концентраций КСl от 0,07 до 0,3 М в буфере А. Активные фракции объединяли и концентрировали осаждением (NH₄)₂SO₄ (70%). После центрифугирования и диализа против буфера А препарат фермента очищали на колонке с сефадексом G-100 (15×1 см) с элюцией буфером А. Фракции, проявляющие ферментативную активность, объединяли и осаждали белок 70% (NH₄)₂SO₄, осадок отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме буфера А. Очищенный препарат фермента хранили при -20° С в 50% глицерине. Перед использованием фермент диализовали при 4° С в течение 12 ч против буфера А. В опытах использовали препарат фермента с удельной активностью 0,3—0,6 ммоль СоАСАс/(мин·мг) белка.

Очистку Ас-СоА-карбоксилазы проводили по следующей методике: печень крыс гомогенизировали 45 с в 2 объемах 0,05 трис-НСl-буфера (рН 7,4), содержащего 20 мМ лимоннокислый натрий, 1 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит, в гомогенизаторе Уорринга. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 20 000g. Супернатант обрабатывали 30% (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали 30 мин при 20 000g. Осадок растворяли в 0,25 М калий-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 20 мМ лимоннокислый натрий, 0,5 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит (буфер Б). К полученному препарату при 4° С по каплям добавляли 40% раствор полиэтиленгликоля-6000 в воде до конечной концентрации 5% и через 20 мин центрифугировали 20 мин при 20 000g. Осадок растворяли в буфере Б и повторно центрифугировали. Супернатант хроматографировали на колонке с DEAE-целлюло-

зой DE-32, элюцию проводили в линейном градиенте концентрации KCl (0,05—0,2 М) в буфере Б. Активные фракции объединяли, белок осаждали 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, центрифугировали, осадок растворяли в минимальном объеме буфера Б. Полученный препарат с удельной активностью 0,1—0,2 мкмоль CoASH/(мин·мг) белка хранили в холодильнике при -50°C .

Активность *Ac-CoA-синтетазы* определяли модифицированным методом Хуанга [17] по прямому включению [^{14}C]ацетата в CoASH. Реакционная смесь объемом 0,25 мл содержала 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 8), 4 мМ MgCl_2 , 0,09 мМ CoASH, 1 мМ дитиотреит, 0,03 мМ [^{14}C]AcONa (10^6 имп/мин) и 0,01 мг белка. Концентрацию АТР и аналогов варьировали в ходе эксперимента от 10^{-2} до 10^{-5} М. После 20 мин инкубации при 30°C реакцию останавливали охлаждением до 0°C с одновременным добавлением 0,05 мл уксусной кислоты. Аликвоту (0,01 мл) наносили на бумагу Ватман 3 ММ (16×14 см) и подвергали восходящей хроматографии в системе Г. При этом CoAS [^{14}C]Ac, очищенный от избытка ацетата, оставался на старте. Через 50 мин хроматограмму высушивали, нарезали мишени (2×2 см) с линии старта и просчитывали радиоактивность в толуольном сцинтиллаторе.

Активность *Ac-CoA-карбоксилазы* определяли модифицированным методом [11]. Измерения начальной скорости ферментативной реакции проводили при 37°C , отбирая во времени пробы по 0,2 мл реакционной смеси, содержащей 60 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,5), 20 мМ лимоннокислый натрий, 8 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреит, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,01—0,02 мг белка. Концентрации субстратов составляли в пробе: CoASAc — 0,2 мМ, $\text{NaH}[^{14}\text{C}]\text{O}_3$ — 10 мМ ($3 \cdot 10^6$ имп/мин). Концентрации АТР и аналогов варьировали в ходе эксперимента от 10^{-2} до 10^{-5} М. Время инкубации 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 6 н. HCl. После центрифугирования пробы при 3000 об/мин в течение 5 мин из супернатанта отбирали пробы по 0,20 мл, переносили их во флаконы для регистрации радиоактивности, высушивали в токе теплого воздуха (80°C), растворяли в 0,2 мл воды и измеряли радиоактивность в диоксановом сцинтиллаторе.

Определение обратимости торможения ферментов аналогами (X) и (XI). АТР-аналоги в концентрациях, дающих 50% снижение скорости ферментативной реакции, преинкубировали с ферментами в 60 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7) при 25°C в течение 6 ч. В контрольных опытах фермент преинкубировали без АТР-аналогов. Результаты опытов для *Ac-CoA-карбоксилазы* приведены на рисунке.

Авторы статьи признательны Р. М. Хомутову за ценные замечания при обсуждении результатов и написании статьи, а также А. Голы за любезное предоставление образца аналога АТР, синтезированного им.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Хомутов Р. М. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 2, с. 213—219.
2. Volpe J. J., Vagelos P. R. *Physiol. Rev.*, 1976, v. 56, № 4, p. 338—417.
3. Hall J. H., Lee K. H., Starnes C. O., Muraoka O., Sumida J., Waddell T. G. *J. Pharm. Sci.*, 1980, v. 69, № 6, p. 694—697.
4. Полякова Э. Д., Денисенко Т. В., Климова Т. А., Дуже Э. Б., Петрова Л. А., Климов А. Н. *Биохимия*, 1976, т. 41, № 6, с. 1067—1078.
5. Vesely J., Rosenberg J., Holy A. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1982, v. 48, № 6, p. 1783—1787.
6. Yount R. G. *Adv. Enzymol.*, 1975, v. 43, p. 1—57.
7. Blackburn G. M. *Chem. Ind.*, 1981, № 2, p. 134—138.
8. Hutchinson D. W., Cloud P. A., Haugh M. C. *Phosphorous and Sulfur*, 1983, v. 14, № 3, p. 285—293.
9. Quimby T. I., Prentice J. B., Nicholson D. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, v. 32, № 12, p. 4111—4114.
10. Myers T. E., Nakamura K., Danielrade A. B. *J. Org. Chem.*, 1965, v. 30, № 4, p. 1517—1520.
11. Inouye H., Lowenstein J. M. *Methods in Enzymol.*, 1975, v. 35, p. 3—11.
12. Lineweaver H., Burk D. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, v. 56, № 3, p. 658—666.
13. Easterbrook-Smith B., Wallace J. C., Keech D. B. *J. Biochem.*, 1976, v. 62, № 1, p. 125—130.

14. Blackburn G. M., Kent D., Kolkman F. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, № 22, p. 1188—1190.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 2, p. 265—275.
16. Тарусова Н. Б., Шулянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 838—843.
17. Huang K. P. Anal. Biochem., 1970, v. 37, № 1, p. 98—104.

Поступила в редакцию
25.IV.1984

После доработки
29.XI.1984.

**ORGANOPHOSPHORUS ANALOGUES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS.
XIV. HALOPHOSPHONATE ANALOGUES OF ATP AS Ac-CoA-CARBOXYLASE
INHIBITORS**

BIRIUKOV A. I., TARUSOVA N. B., AMONTOV S. G.,
OSIPOVA T. I., GORIACHENKOVA E. V., RABINKOV A. G.*

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

** Institute of the Biological Testing of Chemical Compounds,
Kupavna, Moscow region*

Halophosphonate ATP analogues pp[CHBr]pA and p[CHBr]ppA synthesised from bromomethylenebisphosphonate and adenosine derivatives, proved to be effective competitive inhibitors of Ac-CoA-carboxylase (CE 6.4.1.2) from rat liver ($K_i=0,2$ mM). The inhibitory effects of both analogues were reversible and higher than those of some other ATP analogues. Another enzyme, Ac-CoA-synthetase (CE 6.2.1.1), with a different mode of ATP-cleavage showed wider specificity to ATP-analogues than Ac-CoA-carboxylase.