



УДК 577.113.5

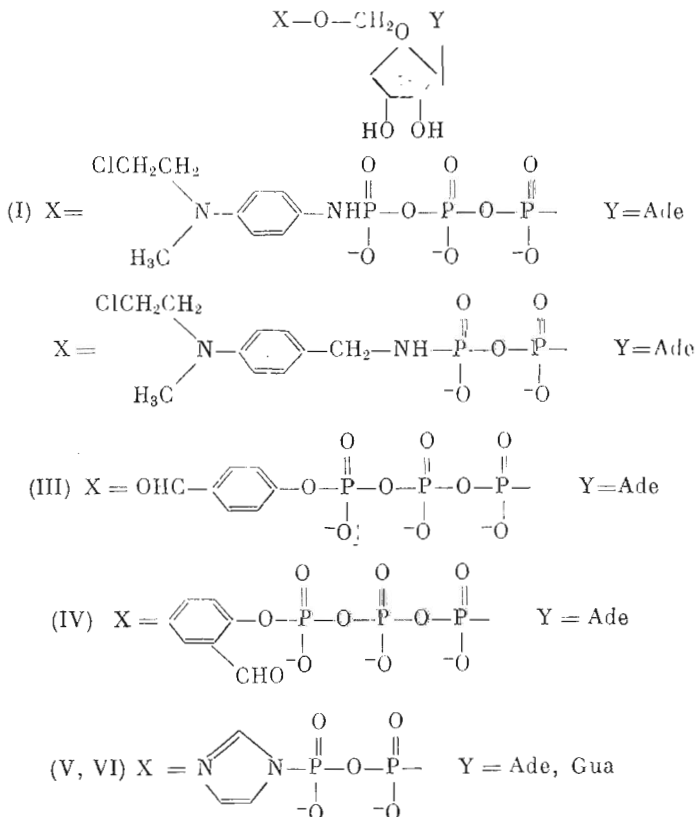
## СИНТЕЗ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕОЗИД-5'-МОНО-, -ДИ- И -ТРИФОСФАТОВ ПО ФОСФАТНОЙ ГРУППЕ

Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А.

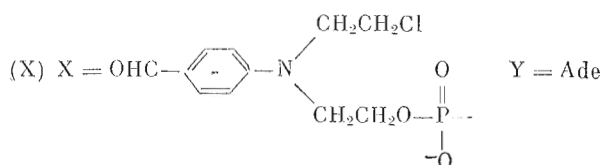
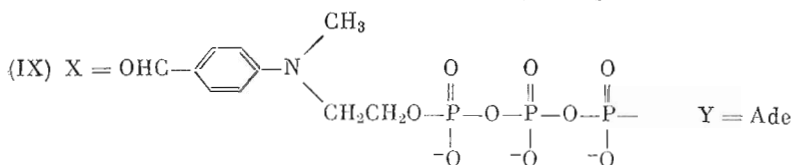
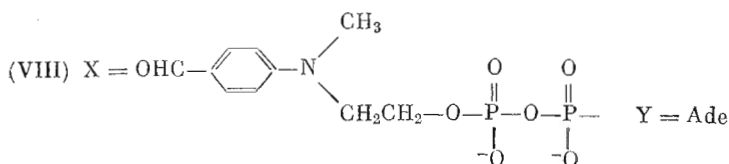
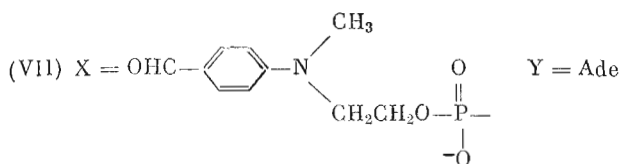
Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Получен ряд реакционноспособных производных аденозин-5'-моно-, -ди- и -трифосфатов, а также гуанозин-5'-дифосфата. Соединения охарактеризованы микроколочной и тонкослойной хроматографией, УФ-спектроскопией, фосфодиэстеразным и кислотным гидролизом. Обсуждаются возможности их использования в качестве аффинных реагентов для исследования нуклеотидзависимых ферментов.

В настоящей работе описан синтез 10 новых реакционноспособных производных нуклеозид-5'-моно-, -ди- и -трифосфатов (I)—(X). Реагенты подобной структуры были с успехом использованы ранее для аффинной модификации АТР-аз, киназ, полимераз, синтетаз (обзор, см. [1]) и могут найти широкое применение для исследования многочисленных ферментативных систем, в которых NTP, NDP, NMP и другие производные нуклеотидов выступают в качестве субстратов, продуктов и кофакторов.

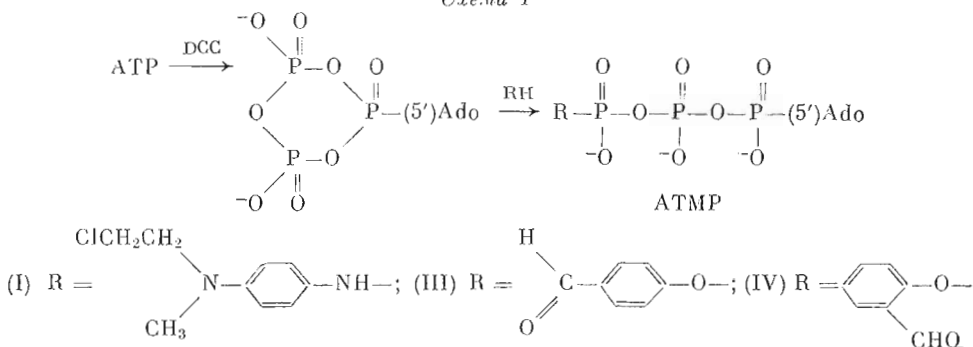


Нестандартные сокращения: АТМР — аденозин-5'-триметафосфат, ДСС — дициклогексилкарбодиймид, DMSO — диметилсульфоксид, DMF — диметилформамид.



Синтез соединений (I)–(X) осуществлялся тремя путями. В случае соединений (I, III, IV) мы воспользовались общим методом получения  $\gamma$ -производных АТР [2], включающим превращение АТР в циклический аденозин-5'-триметафосфат (АТМР) под действием дициклогексилкарбодиимида в диметилсульфоксиде и последующую реакцию АТМР с соответствующими оксибензальдегидами и аминами (схема 1).

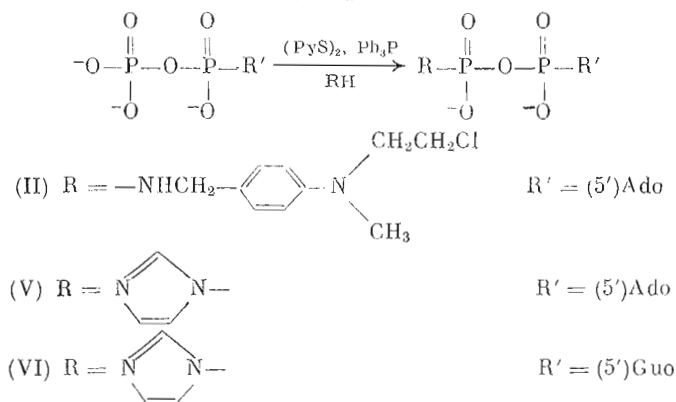
Схема 1



Поскольку свободное основание 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)анилина, использованное при синтезе соединения (I), весьма неустойчиво, его получали из хлоридрата путем обработки триэтиламино непосредственно в смеси, содержащей АТМР. При синтезе соединений (III), (IV) в реакционную смесь также добавляли триэтиламин, так как образующаяся при этом ионизованная форма оксибензальдегидов, как известно, более реакционноспособна в реакции фосфорилирования. Несмотря на это, реакцию пришлось проводить в довольно жестких условиях (37° С, 4 сут), так как нуклеофильность фенольного кислорода мала. Она значительно ниже нуклеофильности аминогрупп алифатических аминов, для которых реакция с АТМР протекает полностью за 1–2 ч при 20° С [2].

При синтезе соединений (II, V, VI), производных АDP и GDP, дифосфатную группу активировали действием 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина в диметилсульфоксиде (схема 2) по [3] в присутствии соответствующего нуклеофила — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина или имидазола.

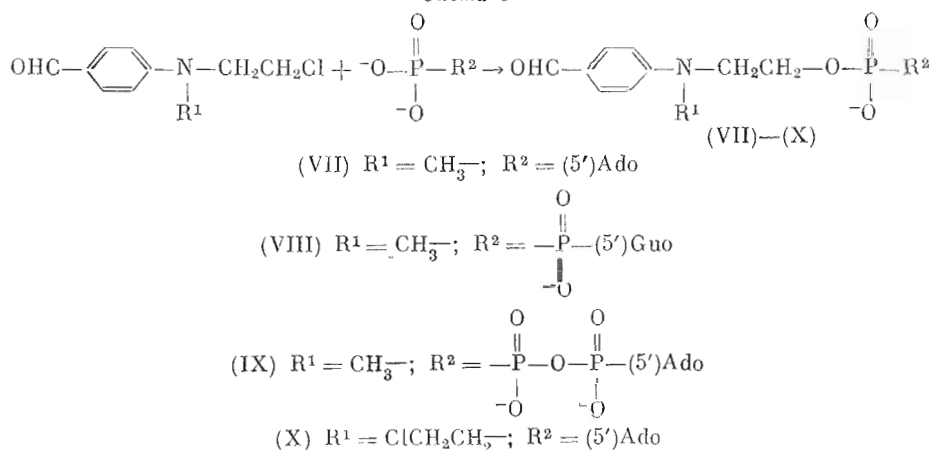
Схема 2



Выделение соединений (I)—(VI) из реакционных смесей осуществляли путем осаждения их литиевых солей при добавлении 1% LiCl в ацетоне. После отмывки ацетоном и метанолом продукты были практически гомогенными (не более 2% примеси исходных нуклеотидов по данным микроколоночной хроматографии) и не требовали дополнительной очистки.

Наконец, соединения (VII)—(X) получали прямым алкилированием концевых фосфатных групп AMP, ADP и ATP соответствующими 2-хлорэтильными производными *n*-аминобензальдегида (схема 3).

Схема 3



Из-за сильной электрооакцепторности формильного остатка реакционная способность 2-хлорэтиламиногруппы в этих производных понижена, поэтому синтез пришлось проводить в жестких условиях: 0,5—2 ч при 95—100° С (VII, VIII, X), 70 ч при 50° С (IX). В результате получались сложные смеси. Например, в реакции ADP с 4-(*N*-2-хлорэтил-*N*-метиламино)бензальдегидом образовывалась смесь AMP, непрореагировавшего ADP, производного AMP (VII) и производного ADP (VIII) (рис. 1). Производное ATP (IX) при 100° С получить вообще оказалось невозможно. Только понижая температуру до 50° С и увеличивая время реакции до 70 ч, удалось получить соединение (IX) с выходом 50% (рис. 2). Соединения (VII)—(IX) были выделены тонкослойной хроматографией, а соединение (X) — обращенно-фазовой хроматографией (см. «Экспериментальную часть»).

После выделения и дополнительной очистки гомогенность всех полученных соединений (I—X) была доказана методом тонкослойной (таблица) и микроколоночной жидкостной хроматографии с многоволновой детекцией [4] (см. «Экспериментальную часть»). По данным микроколоночной хроматографии, в нейтральном растворе они имели на один отрицательный заряд меньше, чем соответствующие исходные нуклеотиды.

Все синтезированные соединения были охарактеризованы с помощью УФ-спектроскопии (таблица). Соединения (III, IV, VII—X) заметно по-

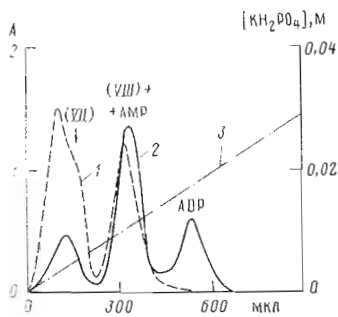


Рис. 1

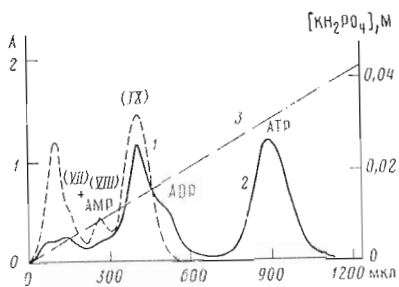


Рис. 2

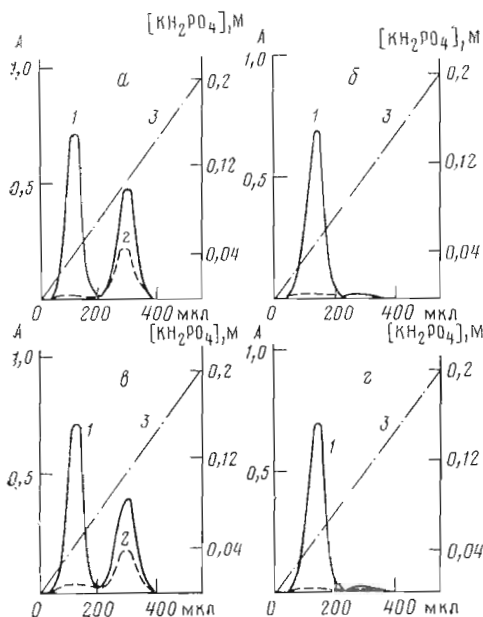


Рис. 3

Рис. 1. Ионообменная микроколоночная хроматография продуктов реакции ADP с 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегидом (100°С, 30 мин) на колонке с сорбентом Lichrosorb-NH<sub>2</sub>. 1 — A<sub>350</sub>, 2 — A<sub>260</sub>, 3 — концентрация фосфатного буфера (рН 7,5)

Рис. 2. Ионообменная микроколоночная хроматография продуктов реакции ATP с 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегидом (50°С, 70 ч) на колонке с сорбентом Lichrosorb-NH<sub>2</sub>. 1 — A<sub>350</sub>; 2 — A<sub>260</sub>; 3 — концентрация фосфатного буфера (рН 7,5)

Рис. 3. Ионообменная микроколоночная хроматография на DEAE-целлюлозе продуктов фосфодиэстеразного гидролиза соединений (II) и (IV) до восстановления (а и в соответственно) и после восстановления NaBH<sub>4</sub> (б и г соответственно). 1 — A<sub>260</sub>; 2 — A<sub>300</sub>; 3 — концентрация буфера (рН 7,5)

глощают в области 290—350 нм, что обусловлено наличием соответствующей ароматической группировки. Восстановление соединений (III, IV, VII—X) боргидридом натрия приводит к резкому изменению УФ-спектров (уменьшение поглощения в области 290—350 нм и увеличение в области 260 нм). Подобным образом ведут себя при восстановлении и исходные окси- и аминокбензальдегиды.

Будучи фосфамидами, соединения (I, II, V и VI) при мягком кислотном гидролизе (рН 2, 40°С, 2 ч (I), 15 ч (II, V, VI)) количественно превращаются в исходные нуклеотиды — соответственно в ATP, ADP, ADP и GDP, идентифицированные микроколоночной хроматографией [4]. По аналогии с методом, описанным в работе [5] для других веществ, для определения содержания 2-хлорэтиламиногрупп в соединениях (I, II) использовали их способность алкилировать этилендиамин. Оказалось, что это содержание составляет 100% для соединения (II) и не менее 60% для соединения (I) \*.

Для дополнительного доказательства строения соединения (III) мы применили гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда. По данным микроколоночной хроматографии, при таком гидролизе образуются два вещества: одно с зарядом —2, другое с зарядом —3 (рис. 3а), причем продукт

\* Пониженное содержание 2-хлорэтиламиногрупп в соединении (I) может объясняться их частичным превращением в 2-оксиэтиламиногруппы; однако полученный продукт сохранял высокую активность как аффинный реагент для РНК-полимеразы, и в связи с этим в данной работе попыток его дополнительной очистки не предпринималось.

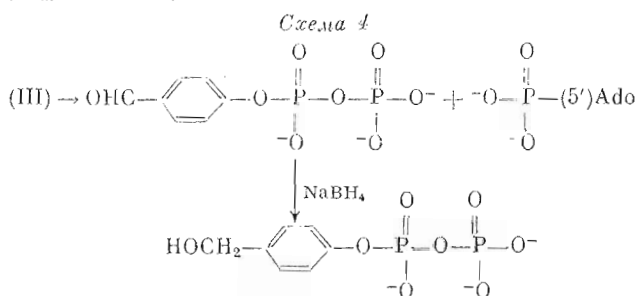
Характеристики синтезированных соединений (I)–(X)

УФ-спектры записывали в водном растворе при pH 7

Соединение	$R_f$ в системе			$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{252}$	$\lambda_{max}$ , nm
	A	Б	В			
(I)	—	0,36	0,38	0,08	0,29	260
(II)	—	0,38	0,46	0,09	0,27	260
(III)	—	0,30	0,28	0,21	0,45	260
(III) *	—	—	—	0,02	0,28	260
(IV)	—	0,33	0,30	0,14	0,23	258
(IV) *	—	—	—	0,08	0,27	260
(V)	0,78	—	—	—	—	260 **
(VI)	0,71	—	—	—	—	252 ***
(VII)	—	0,41	0,53	0,17	0,67	258,360
(VII) *	—	—	—	0,10	0,25	260
(VIII)	—	0,28	0,40	0,20	0,46	258,360
(VIII) *	—	—	—	0,12	0,34	260
(IX)	—	0,26	0,33	0,21	0,44	258,360
(IX) *	—	—	—	0,10	0,31	260
(X)	—	0,48	0,56	0,24	0,34	254,347
(X) *	—	—	—	0,10	0,20	260
АТФ	—	0,06	0,08	—	—	—
АДР	0,26	0,10	0,12	—	—	—
АМР	—	0,13	0,16	—	—	—
GDP	0,13	0,05	0,06	—	—	—

\* После восстановления 0,01 М боргидридом натрия в течение 30 мин при 20° С.  
 \*\*  $A_{260}/A_{280}=0,70$ .  
 \*\*\*  $A_{260}/A_{252}=0,52$ .

с зарядом  $-2$  имеет спектральные характеристики, идентичные характеристикам АМР, а продукт с зарядом  $-3$  — характеристики, идентичные характеристикам исходного альдегида. При хроматографии продуктов фосфодиэстеразного гидролиза, предварительно обработанных боргидридом натрия, с детекцией при 260 нм продукт с зарядом  $-3$  «исчезал», поскольку образующееся при восстановлении производное *n*-оксибензилового спирта (схема 4) практически не поглощает в этой области (рис. 3б). Аналогично вело себя при фосфодиэстеразном гидролизе и соединение (IV) (рис. 3в, г).



Для подтверждения правильности структур (VII)–(X) мы провели обработку этих соединений фосфомоноэстеразой. Оказалось, что они устойчивы к ферменту, хотя добавленный в смесь АТФ при этом полностью превращается в аденозин. Это доказывает, что обнаруживаемая по УФ-спектрам бензальдегидная группа соединений (VII)–(X) действительно связана с фосфатным остатком, а не с адениновым ядром.

В случае соединения (X) было дополнительно определено содержание интактных 2-хлорэтиламиногрупп. При инкубации в жестких условиях (95° С, 0,01 М триэтанолламин-НСl, pH 9) (в отсутствие сильных нуклеофилов) наблюдалось образование единственного продукта с подвижностью при обращенно-фазовой хроматографии, большей, чем у исходного соединения (время полупревращения 25 мин). Очевидно, это соединение представляло собой продукт гидролиза 2-хлорэтиламиногруппы соединения

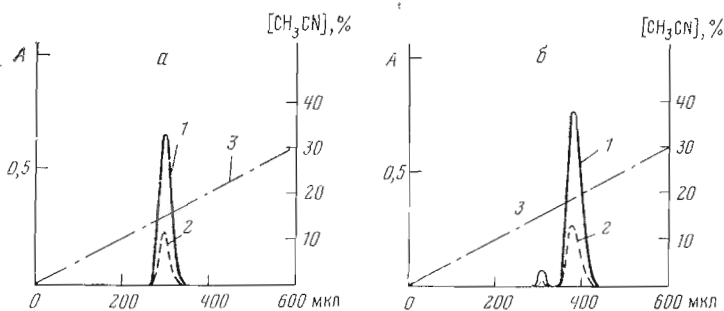
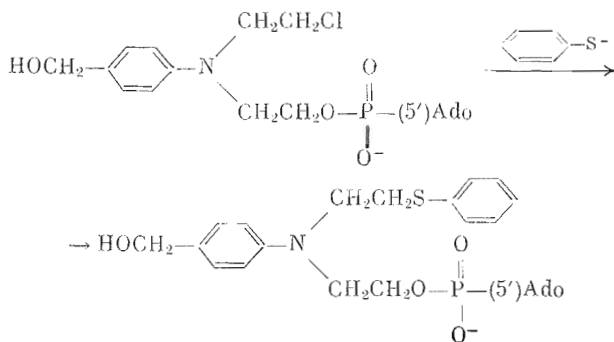


Рис. 4. Обращенно-фазовая хроматография на Lichrosorb RP-18. а — продукт реакции соединения (X) с  $\text{NaBH}_4$ ; б — продукт последовательной обработки соединения (X)  $\text{NaBH}_4$  и тиофенолом.  
1 —  $A_{260}$ ; 2 —  $A_{240}$ ; 3 — концентрация ацетонитрила

(X). Продукт восстановления соединения (X) боргидридом натрия при инкубации с тиофенолятом количественно обменивал Cl на остаток SPh (с уменьшением подвижности при обращенно-фазовой хроматографии, см. рис. 4):



Из этих данных можно было заключить, что содержание ковалентно связанного хлора в соединении (X) близко к стехиометрическому.

Синтезированные соединения по их реакционной способности можно разделить на три группы: 1) алкилирующие (I, II, X); 2) фосфорилирующие (V, VI); 3) соединения с альдегидной группой (III, IV, VII—X).

Соединения (I, II, X) предназначены для алкилирования нуклеофильных групп белков. Лимитирующей стадией при алкилировании ими является образование короткоживущего, высокореакционноспособного азиридинового иона. Соединение (X) сконструировано по тому же принципу, что и описанные ранее [6] алкилирующие реагенты с регулируемой алкилирующей активностью. Из-за сильного электроноакцепторного эффекта альдегидного карбонила реакционная способность 2-хлорэтиламиногруппы в этом соединении сильно понижена, и при физиологических условиях она устойчива. Восстановление альдегидной группы до спиртовой, снимая электроноакцепторный эффект, приводит к активации 2-хлорэтиламиногруппы, и время ее полупревращения в азиридиновый ион становится равным ~50 мин при 37° С. Соединение (X) можно использовать и как бифункциональный реагент, на первой стадии вводя альдегидную группу в реакцию с аминогруппой белка, а затем, после боргидридного восстановления образовавшегося основания Шиффа, вводя в реакцию 2-хлорэтиламиногруппу.

Соединения (V, VI) являются фосфорилирующими реагентами. Они быстро реагируют с аминами с образованием соответствующих фосфамидов. Фосфорилирование воды, спиртов и тем более меркаптанов протекает значительно медленнее.

Соединения (III, IV, VII—IX) содержат альдегидные группы, способные реагировать с аминогруппами белков с образованием оснований Шиффа, которые для повышения прочности ковалентной привязки можно восстановить боргидридом. Эти соединения могут служить зондами для

обнаружения остатков лизина вблизи участка связывания фосфатного остатка в различных нуклеотидзависимых ферментах.

Все синтезированные соединения являются аналогами иницирующих субстратов ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* и предназначены для исследования этого фермента методом аффинной модификации.

### Экспериментальная часть

В работе использовали АТР, АДР, АМР и GDP (Reanal, ВНР), 2,2'-дипиридилдисульфид (Merck, ФРГ), DCC и NaBH<sub>4</sub> (Serva, ФРГ). Щелочную фосфатазу *E. coli* любезно предоставил В. Ф. Подгорный, иммобилизованную на бромциансофарозе фосфоэстеразу эмбриона яда с активностью 0,2 ед. акт./мг — С. А. Грачев. 4-(N-2-Хлорэтил-N-метиламино)бензиламин (дигидрохлорид) был получен в группе наработки Новосибирского института органической химии. 4-(N-2-Хлорэтил-N-метиламино)анилин (гидрохлорид) был синтезирован по методике [7]. 4-(N,N-Бис-2-хлорэтиламино)бензальдегид и 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегид были любезно предоставлены Г. Г. Карповой. Остальные реактивы имели квалификацию х.ч. или ос.ч.

Для анализа продуктов реакции и проверки гомогенности полученных соединений применяли метод микроколоночной хроматографии с многоволновой детекцией в системе Томлинсема — Тенера (7 М мочевины, калий-фосфатный градиент, pH 7,5) на DEAE-целлюлозе и сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> (Serva, ФРГ), используя хроматограф «Обь-4» [4]. Предварительную проверку гомогенности, а также очистку соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV 254 (Kavalier) и Kieselgel-60F 254 (Merck, ФРГ) в системах диоксап — вода — конц. NH<sub>4</sub>OH, 6 : 4 : 1 (А), ацетонитрил — вода, 4 : 1 (Б), хлороформ — метанол — вода, 4 : 4 : 1 (В). УФ-спектры записывали на приборе Specord UV-VIS (Karl Zeiss).

*4-(N-2-Хлорэтил-N-метиламино)-γ-анилид АТР (I)*. Активацию АТР проводили согласно работе [2] с некоторыми модификациями. К раствору 5 мг (6 мкмоль) триэтиламмониевой соли АТР в 50 мкл DMSO добавляли 10 мг (50 мкмоль) DCC и 5 мкл 1 М раствора хлористого пиридиния в DMSO. Смесь выдерживали 1,5 ч при 20° С и добавляли раствор 15 мг (7 мкмоль) гидрохлорида 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)анилина, 15 мкл 2-меркаптоэтанола и 20 мкл триэтиламина в 20 мкл метанола. Через 5 ч продукт осаждали 1 мл 1 % раствора LiCl в ацетоне, осадок промывали 3 раза ацетоном и 1 раз метанолом и сушили в вакууме. Выход 70%.

*4-(N-2-Хлорэтил-N-метиламино)-β-бензиламид АДР (II)*. Активацию АДР 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина проводили согласно работе [3] с некоторыми модификациями. К раствору, содержащему 80 мг (110 мкмоль) триэтиламмониевой соли АДР, 240 мг (0,9 ммоль) 2,2'-дипиридилдисульфида и 240 мг (1,1 ммоль) трифенилфосфина в 800 мкл DMSO добавляли раствор 120 мг (2,2 ммоль) дигидрохлорида 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина и 90 мкл триэтиламина в 200 мкл метанола. Через 1 ч инкубации при 20° С продукт выделяли в виде литиевой соли как описано для соединения (I). Выход 80%.

*4-Формил-γ-фениловый эфир АТР (III) и 2-формил-γ-фениловый эфир АТР (IV)*. Активацию АТР с помощью DCC проводили как описано выше в расчете на 25 мг (30 мкмоль) АТР (триэтиламмониевая соль). К смеси, содержащей циклический аденозин-5'-триметафосфат, добавляли: в первом случае раствор 100 мг (0,8 ммоль) перекристаллизованного *p*-оксибензальдегида и 100 мкл (0,8 ммоль) триэтиламина в 100 мкл абс. DMF, во втором случае — смесь 180 мкл (1,6 ммоль) *o*-оксибензальдегида, 210 мкл (1,6 ммоль) триэтиламина и 150 мкл абс. DMF. Реакционные смеси инкубировали 4 сут при 37° С. Выделение продуктов в виде литиевых солей проводили как описано выше. Выход соединений (III, IV) 80 и 90% соответственно.

*Имидазолиды АДР (V) и GDP (VI)*. 5 мг (6 мкмоль) триэтиламмониевой соли АДР или GDP и 20 мг имидазола растворяли в 50 мкл DMSO. Затем добавляли по 50 мг 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина. Инкубировали 2 ч при 37° С и полученный продукт в виде литиевой соли выделяли как описано выше. Выход соединений (V), (VI) 95%.

*4-(N-Метил-N-2-(аденилил-5'-моно- и -дифосфорил)этиламино)бензальдегид (VII), (VIII)*. Смесь 30 мг (52 мкмоль) АДР (Na<sub>2</sub>-соль) и 90 мг (0,45 ммоль) (N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида растворяли

в 1,2 мл 50% водного DMF, добавляли 10 мкл триэтиламина и выдерживали 30 мин при 100° С. Затем реакционную смесь подвергали 3-кратной экстракции эфиром и водную фазу анализировали ТСХ и микроколоночной хроматографией. Для идентификации продуктов при ТСХ использовали их окрашивание 2,4-динитрофенилгидразином. Для препаративного выделения полученных соединений из реакционной смеси использовали ТСХ на пластинках Kieselgel в системе С. Выход соединений (VII) и (VIII) 30%.

4-[N-Метил-N-2-(аденилил-5'-трифосфорил)этиламино]бензальдегид (IX). 25 мг (45 мкмоль) АТР (Na<sub>2</sub>-соль) и 50 мг (0,25 ммоль) 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида растворяли в 1,2 мл 50% водного DMF. Затем добавляли 10 мкл триэтиламина и инкубировали смесь 70 ч при 50° С. Анализ реакционной смеси, выделение и очистку продукта проводили так же, как и в случае соединений (VII, VIII). Выход 50%.

4-[N-(2-Хлорэтил)-N-2-(аденилил-5'-монофосфорил)этиламино]бензальдегид (X). К 5 мг (10 мкмоль) АМР (Na<sub>2</sub>-соль) в 100 мкл воды добавляли 15 мг (80 мкмоль) 4-[N,N-бис-(2-хлорэтил)амино]бензальдегида в 100 мкл DMF. Смесь инкубировали 2 ч при 95° С, охлаждали и трижды экстрагировали эфиром. Продукт выделяли из водной фазы препаративной ТСХ на пластинках Kieselgel в системе В или обращенно-фазовой хроматографией на хроматографе Altex на колонке (объем 4 мл) с сорбентом Nucleosil 5-C18 в линейном градиенте (200 мл) ацетонитрила в 0,05 М LiClO<sub>4</sub>. Выход 20%.

Полный кислотный гидролиз соединений (I, II, V, VI). Водный раствор (1 мМ) вещества подкисляли 1 М HCl до pH 2 и нагревали при 40° С. Через 2 ч в случае соединения (I) и через 15 ч в случае соединений (II, V, VI) продукты гидролиза анализировали микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Определение содержания 2-хлорэтиламиногрупп в соединениях (I, II) [5]. 100 мкл 0,1 М раствора этилендиамина (pH 8), содержащего 0,01 ммоль соединения (I) или (II), термостатировали при 40° С. Через 3 ч продукты реакции анализировали микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Восстановление боргидридом натрия соединений (VII)–(X). К 0,5 мМ водному раствору одного из соединений добавляли 1 М раствор NaBH<sub>4</sub> до концентрации 10 мМ и выдерживали 30 мин при 20° С. За полнотой протекания реакции следили по изменению поглощения этих соединений при 300 нм (III, IV) или 350 нм (VII–X).

Фосфодиэстеразный гидролиз соединений (III, IV). К 50 мкл взвеси, содержащей 0,2 мг иммобилизованной фосфодиэстеразы в буфере состава 0,01 М трис-HCl (pH 8,5), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, добавляли 0,5 мкмоль одного из соединений. После инкубации при 40° С в течение 1,5 ч смесь центрифугировали и из раствора отбирали две пробы. Первую пробу сразу подвергали микроколоночной хроматографии, а вторую сначала восстанавливали боргидридом как описано выше (рис. 3).

Обработка реагентов (VII–X) фосфомоноэстеразой E. coli. К 9 мкл раствора, содержащего 1 мкл раствора щелочной фосфатазы активностью 10 мкмоль/мин·мкл в буфере состава 10 мМ трис-HCl (pH 9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ меркаптоэтанол, добавляли 1 мкл 10 мМ раствора одного из реагентов или АТР. Смесь инкубировали 2 ч при 56° С. Продукты анализировали ТСХ в системе А.

Кинетика гидролиза соединения (X). Раствор, содержащий 7 ОЕ<sub>260</sub>/мл соединения (X) в 0,01 М буфере триэтанолламин — HCl, pH 9, выдерживали при 95° С, отбирали аликвоты и анализировали обращенно-фазовой хроматографией на колонке с сорбентом Lichrosorb RP-18 в ступенчатом градиенте ацетонитрила (0, 10, 20, 40, 60, 80%, общий объем 1200 мкл), содержащего 0,05 М LiClO<sub>4</sub>, 0,5 мМ трис-HCl, pH 8, и 25 мкМ EDTA, используя хроматограф «Объ-4» [4]. Скорость элюции 100 мкл/мин.

Кинетика алкилирования тиофенола соединением (X) после боргидридного восстановления. К 50 мкл раствора соединения (X) (7 ОЕ<sub>260</sub>/мл) добавляли 5 мкл 1 М раствора NaBH<sub>4</sub>, выдерживали 5 мин при 20° С, добавляли



5 мкл 0,1 М тиофенола (рН 10) и инкубировали при 37° С. Аликвоты реакционной смеси анализировали обращенно-фазовой хроматографией как описано выше. Судя по данным микроколоночной хроматографии, реакция заканчивалась за 3 ч (рис. 4).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Soviet Scientific Reviews, Section D, Biology Reviews/Ed. Skulachev V. P. Switzerland Harwood Acad. Publ. GmbH, 1981, v. 2, p. 107—143.
2. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. FEBS Lett., 1976, v. 70, № 1, p. 105—108.
3. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886—894.
4. Varat G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. J. Chromatogr., 1983, v. 264, № 1, p. 69—90.
5. Зарьтова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 793—798.
6. Grachev M. A., Mustaev A. A., Oshevsky S. I. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 9, p. 3413—3426.
7. Добрыков М. И., Мустаев А. А., Шишкин Г. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим., 1982, вып. 9, с. 141—148.

Поступила в редакцию  
3.XII.1985  
После доработки  
24.II.1986

#### SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF NUCLEOSIDE 5'-MONO-, DI-, AND TRIPHOSPHATES WITH REACTIVE GROUPS ATTACHED TO PHOSPHATE RESIDUES

GRACHEV M. A., LUKHTANOV E. A., MUSTAEV A. A.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian  
Branch of the Academy of Sciences of USSR, Novosibirsk*

Ten new reactive derivatives of nucleoside 5'-mono-, di-, and triphosphates — potential affinity reagents — have been synthesized. These are 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)- $\gamma$ -amidate of ATP (I); 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)- $\beta$ -benzylamidate of ADP (II); 4-formyl- and 2-formylphenyl  $\gamma$ -esters of ATP (III, IV);  $\beta$ -imidazolides of ADP and GDP (V, VI); (N-4-formylphenyl-N-methyl)-2-aminoethyl esters of AMP, ADP, and ATP (VII, VIII, IX); (N-4-formylphenyl-N-2-chloroethyl)-2-aminoethyl ester of AMP (X). The compounds (I, II, X) have an alkylating activity. The latter is not exhibited by X under physiological conditions because of the electron-acceptor effect of the formyl residue; however, its alkylating activity may be some 1000 times increased by reduction of the formyl residue with borohydride. The compounds (III, IV, VII—X) contain formyl functions reactive towards amino groups. The compounds (V, VI) are phosphorylating reagents. The analogs obtained have been characterized by chromatographic behavior and UV-spectra.