



УДК 577.113.6:547.963.32

СИНТЕЗ 9-(β -D-РИБОФУРАНОЗИЛ)-6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА
И АФФИШНОГО СОРБЕНТА НА ЕГО ОСНОВЕЗинченко А. И., Барай В. И., Ляховец В. И.,
Кудлак Т. И. *, Квасюк Е. И. *, Михайловичо И. А. *

Институт микробиологии Академии наук БССР, Минск;

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Изучено микробиологическое транскрибозилирование природного цитокинина — 6-бензиламинопурина клетками *Escherichia coli* БМ-11 с использованием уридина в качестве донора углеводного фрагмента. Найдены оптимальные условия реакции трансгликозирования: 10–30 мМ фосфатный буфер (рН 6,5–7,5), температура 57–63°С и соотношение уридина — 6-бензиламинопурина 3 : 1. Синтезировано 2,3-ди-О-(2-карбокситил)этилиденовое производное (6-бензиламинопурина-9-ил)рибозида, использованное в качестве лиганда для получения аффинного сорбента путем его ковалентного связывания с аминогексилсефарозой 4В.

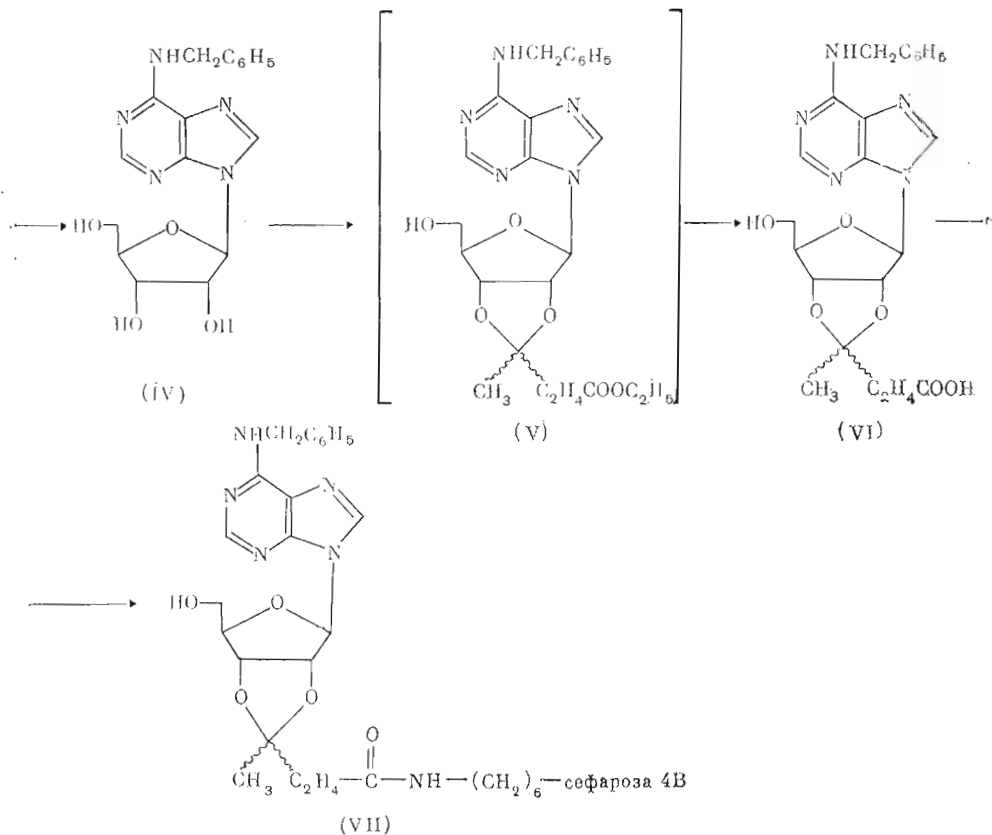
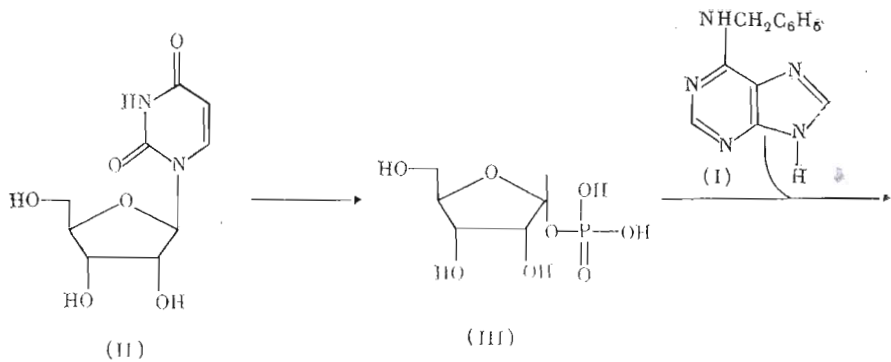
Выяснение роли фитогормонов в жизнедеятельности клетки требует всестороннего изучения структуры и физико-химических свойств рецепторных белков. Выделение рецепторов фитогормонов в чистом виде представляет сложную задачу ввиду их лабильности, а также низкого содержания в биологическом материале. Поэтому использование таких методов фракционирования, как ионообменная и гельпроникающая хроматография, электрофорез и т. п., в данном случае неэффективно. В этой связи более перспективным методом выделения рецепторов может оказаться аффинная хроматография на сорбентах, представляющих собой иммобилизованные на полимерной матрице фитогормоны. Среди таких сорбентов до настоящего времени при очистке белков, специфически связывающих фитогормоны, применяли рибозид кинетина, окисленный периодатом и химически связанных с аммоно-сефарозой [1], а также 6-бензиламинопурина (ВАР, I), иммобилизованный на эпоксиактивированной [2–4] или бромцианактивированной [5] сефарозной матрице.

В настоящей работе нами осуществлен синтез нового аффинного сорбента на основе ВАР. Схема его получения включает синтез 9-(β -D-рибофуранозил)-6-бензиламинопурина (ВАР-рибозида, IV) с использованием микробиологического метода, описанного нами ранее на примере рибозилирования кинетина [6], получение 2,3-ди-О-(2-карбокситил)этилиденового производного ВАР-рибозида (VI) и, наконец, конденсацию последнего с АН-сефарозой карбодимидным методом (схема).

Впервые ВАР-рибозид (IV) был синтезирован путем многоступенчатого химического синтеза [7]. Позднее был использован ферментативный метод получения этого соединения с использованием частично очищенной аденозинфосфорилазы из зерен пшеницы — фермента, катализирующего синтез рибозидов кинетина и ВАР из α -D-рибофуранозилфосфата (III) и соответствующих цитокининовых оснований [8]. На наш взгляд, более перспективным представляется использование для этой цели ферментов микроорганизмов, в частности бактериальных нуклеозидфосфорилаз, которые способны трансгликозилировать различные гетероциклические основания, в том числе и модифицированные [9–11].

Для синтеза ВАР-рибозида была использована методология, описанная нами ранее [10]. В результате равновесной реакции фосфоролита

Сокращения: ВАР — 6-бензиламинопурина, АН-сефароза 4В — аминогексилсефароза 4В.



уридина (II) под действием уридинфосфорилазы образуются уридин и α -D-рибофуранозилфосфат (III). Последний выступает в качестве субстрата другой равновесной реакции, катализируемой пуридинуклеозидфосфорилазой, в результате чего образуется ВАР-рибозид (IV) [10–12]. В качестве источника обеих фосфорилаз использовались целые клетки *E. coli* БМ-11 без разрушения и выделения индивидуальных ферментов. Следует подчеркнуть, что фосфорилиз уридина и синтез ВАР-рибозида по описанной выше схеме проводили в составе одной реакционной смеси.

С целью оптимизации условий реакции трансгликозилирования было изучено влияние pH и концентрации фосфатного буфера, температуры, концентрации бактериальных клеток и молярного соотношения уридина и ВАР в исходной инкубационной среде на выход ВАР-рибозида. Было найдено, что оптимальные значения большинства параметров совпадают с таковыми для реакции синтеза 9-(β -D-арабинофуранозил)аденина, подробно изученной нами ранее [10], а именно: 10–30 мМ фосфатный буфер с pH 6,5–7,5, температура реакции 57–63° С, соотношение уридина и ВАР 3 : 1. В этих условиях выход ВАР-рибозида составляет 60–65%, что

позволяет рассматривать микробиологическое трансглюкозилирование в качестве препаративного метода получения указанного соединения.

Ранее на ряде примеров было показано [13–15], что использование (2-карбоксиил)этилиденовой группы для связывания нуклеозидов и нуклеотидов с матрицей приводит к получению высокоэффективных аффинных сорбентов для выделения ферментов обмена нуклеиновых кислот. Это побудило нас использовать аналогичный метод для связывания ВАР-рибозидов с АН-сефарозой 4В. Конденсацией рибозидов (IV) с диэтилацеталем этилового эфира леволиновой кислоты в диметилформамиде в присутствии HCl в соответствии с данными работы [16] был получен 2',3'-ди-О-(2-этоксикарбонилэтил)этилиден-6-N-бензиладенозин (V) с выходом 93%, который в результате обработки 1 М раствором NaOH в смеси вода — этанол (1:1) был превращен в 2',3'-ди-О-(2-карбоксиил)этилиден-6-N-бензиладенозин (VI) с выходом 79%. Структура соединений (IV) и (VI) была доказана на основании данных УФ- и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Химическое связывание соединения (VI) с АН-сефарозой 4В было осуществлено с использованием N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида по методу [13]. Количество химически связанного лиганда, определенное по методу [17], составило 1,5 мкмоль на 1 мл пабухшего геля, или 6,0 мкмоль на 1 г сухой АН-сефарозы 4В.

Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ). Хроматография в тонком слое (ТСХ) проводилась на пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР). Системы растворителей: охлажденная до 0–4°С вода (А); хлороформ — метанол, 19:1 (Б). Колончатая хроматография проводилась на силикагеле L 40/100 (ЧССР).

Клетки *E. coli* BM-11 из коллекции Института микробиологии АН БССР выращивали глубинным культивированием при 37°С в лабораторном ферментере АК-3, содержащем 2 л мясо-пептонного бульона с 0,5% дрожжевого экстракта. Время культивирования 12 ч. Аэрация 0,77 л/мин на 1 л среды. Биомассу собирали центрифугированием при 4500 г в течение 10 мин, промывали 25 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим 0,85% NaCl.

9-(β-D-Рибофуранозил)-6-бензиламинопури́н (IV). Реакционную смесь, содержащую 6,5 г (26,6 ммоль) уридина (II), 2,0 г (8,93 ммоль) 6-бензиламинопурина (I) и 0,3 г (в расчете на сухую массу) клеток *E. coli* BM-11 в 1 л 20 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0) инкубировали с легким перемешиванием при 60°С в течение 3–4 ч, осуществляя контроль за ходом реакции методом ТСХ (система А). По окончании реакции клетки удаляли центрифугированием и супернатант упаривали до 200 мл. К полученному раствору добавляли 2 М КОН до рН 9,5 и выдерживали 6–8 ч при 4–6°С. Выпавший осадок ВАР-рибозидов (IV) отфильтровывали, промывали холодной водой, растворяли в 400 мл воды и обрабатывали 2 см³ анионообменной смолы АРА-12П в ОН⁻-форме. Смола отфильтровывали, раствор охлаждали и собирали выпавший осадок. Получили 1,95 г (61,3%) соединения (IV). Т. пл. 182–183°С ([10]: т. пл. 177–179°С), R_f 0,32 (А). УФ-спектр в этаноле, λ_{max} = 271 нм (lg ε 4,29). ¹H-ЯМР-спектр ((CD₃)₂SO₂, δ, м. д. от ТМС; J, Гц): 8,33с (1H) и 8,16с (1H; 8-H, 2-H); 7,24м (5H, ароматика); 5,84с (1H, 1'-H, J_{1', 2'} 6,5); 4,72с (2H, CH₂Ph); 4,57дд (1H, 2'-H, J_{2', 1'} 6,5; J_{2', 3'} 5,0); 4,12дд (1H, 3'-H, J_{3', 2'} 5,0; J_{3', 4'} 3,0); 3,93м (1H, 4'-H, J_{4', 3'} 3,0; J_{4', 5'} = J_{5', 4'} 4,0); 3,57м (2H, 5', 5''-H, J_{5', 4'} = J_{5'', 4''} 4,5, 0). Найдено, %: С 57,00; Н 5,38; N 19,44. C₁₇H₁₉O₄N₅. Вычислено, %: С 57,13; Н 5,36; N 19,60.

6-Бензиламинопури́н-9-ил)-2,3-ди-О-(2-карбоксиил)этилиден-β-D-рибозид (VI). Раствор 0,30 г (0,84 ммоль) ВАР-рибозидов (IV) и 0,86 мл (0,86 г, 3,94 ммоль) диэтилацетата этилового эфира леволиновой кислоты в 3 мл диметилформамида охлаждали до 0°С и добавляли по каплям при перемешивании 0,75 мл 7 М раствора HCl в диоксане. Выдерживали при комнатной температуре 3 ч и при перемешивании добавляли к 200 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, растворяли в 100 мл хлороформа, промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×50 мл), сушили безводным сульфатом натрия, упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле (50 см², элюция градиентом метанола 1–10% в хлороформе общим объемом 1 л). Фракции, содержащие (6-бензиламинопури́н-9-ил)-2,3-ди-О-(2-этоксикарбонилэтил)этилиден-β-D-рибозид (V) объединяли и упаривали. Получено 0,38 г соединения (V) в виде бесцветного масла, которое растворяли в смеси 4,5 мл этанола с 4,5 мл 1 М раствора NaOH в воде, выдерживали при комнатной температуре 20 мин, разбавляли смесью 50 мл воды с 50 мл этанола и нейтрализовали амберлитом IRC-50 в Н⁺-форме. Смола удаляли, упаривший дсуха остаток кристаллизовали из метанола. Получили 0,30 г (78,8%) соединения (VI). Т. пл. 199–200°С; R_f 0,30 (система Б). УФ-спектр в воде: λ_{max} 271 нм (lg ε 4,23). ¹H-ЯМР-спектр ((CD₃)₂SO₂, δ, м. д. от ТМС; J, Гц): 8,31с (1H) и 8,09с (1H, 8-H и 2-H); 7,15м (5H, ароматика); 6,04д (1H, 1'-H, J_{1', 2'} 3,0); 5,24дд (1H, 2'-H, J_{2', 1'} 3,0; J_{2', 3'} 6,0); 4,92дд (1H, 3'-H, J_{3', 2'} 6,0; J_{3', 4'} 3,0); 4,70м (2H, CH₂Ph);

4,15м (III, 4'-H); 3,49м (2H, 5', 5''-H); 2,04м (4H, -(CH₂)₂-: 1,24с (3H, Me). Найдено, %: С 57,80; Н 5,42; N 15,18. С₂₂H₂₅O₆N₆. Вычислено, %: С 58,01; Н 5,53; N 15,38.

Синтез аффинного сорбента. К раствору 30 мг (0,065 ммоль) соединения (VI) в 6 мл воды добавляли 0,9 г АН-сефарозы 4 В, предварительно промытой 0,5 М раствором NaCl и водой. После перемешивания в течение 10 мин к суспензии добавляли 60 мг (0,31 ммоль) хлоргидрата N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимиды и перемешивали смесь 20 ч. Сорбент (VII) отфильтровывали, промывали 40 мл 0,1 М раствора NaHCO₃, 40 мл 0,01 М раствора HCl, 20 мл 0,05 М раствора NaCl и водой до отрицательной реакции на ион хлора.

Содержание лиганда в полученном сорбенте (VII), определенное по разнице поглощения при 260 нм для гидролизованного 0,5 М раствором HCl аффинного сорбента (VII) и АН-сефарозы 4В [17], составило 1,5 мкмоль на 1 мл набухшего геля, или 6,0 мкмоль на 1 г сухой сефарозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moore F. H. // *Plant Physiol.* 1979. V. 64. № 4. P. 594-599.
2. Романко Е. Г., Селиванкина С. Ю., Овчаров А. К., Кулаева О. Н. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 4. С. 1009-1011.
3. Романко Е. Г., Селиванкина С. Ю., Мошков П. Е., Новикова Г. В. // Физiol. раст. 1986. Т. 33. № 6. С. 1078-1083.
4. Федина А. Б., Бурханова Э. А., Харченко В. П. // Физиол. раст. 1987. № 2. С. 324-328.
5. Yoshida K., Takegami T. // *J. Biochem.* 1977. V. 81. № 3. P. 791-799.
6. Mikhailopulo I. A., Kvasnyuk E. I., Lyakhovets V. I., Popov I. L., Eroshvskaya L. A., Barai V. N., Zintchenko A. I. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1984. № 14. P. 291.
7. Kissman H. M., Weiss M. J. // *J. Org. Chem.* 1956. V. 21. № 8/9. P. 1053-1055.
8. Chen C. M., Petschow B. // *Plant. Physiol.* 1978. V. 62. № 6. P. 874-874.
9. Krenitsky T. A., Koszalka G. W., Tuttle J. V. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. № 14. P. 3615-3621.
10. Ерошевская Л. А., Барай В. Н., Зинченко А. И., Квасюк Е. И., Михайлопуло И. А. // Антибиот. мед. биотехнол. 1986. Т. 31. № 3. С. 174-178.
11. Zintchenko A. I., Eroshvskaya L. A., Barai V. N., Mikhailopulo I. A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1987. № 18. P. 137-140.
12. Зинченко А. И., Барай В. Н., Ерошевская Л. А., Бейгельман Л. Н., Михайлов С. Н., Карнейский М. Я., Михайлопуло И. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. № 3. С. 731-733.
13. Seela F., Waldek S. // *Nucl. Acids Res.* 1975. V. 2. № 12. P. 2343-2354.
14. Rosemeyer H., Seela F. // *Carbohydr. Res.* 1978. V. 62. № 1. P. 155-161.
15. Rosemeyer H., Seela F. // *J. Med. Chem.* 1979. V. 22. № 12. P. 1545-1547.
16. Rosemeyer H. *Immobilisierete Ribonucleoside - ihre Synthese und Bioaffinität: Dissertation.* Paderborn. 1980. P. 1-138.
17. Квасюк Е. И., Кулак Т. И., Зайцева Г. В., Михайлопуло И. А., Пфляйдерер В. // Биорган. химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 506-514.

Поступила в редакцию
12.IV.1988.

SYNTHESIS OF 9-(β-D-RIBOFURANOSYL)-6-BENZYLAMINOPURINE AND AN AFFINITY SORBENT ON ITS BASIS

ZINCHENKO A. I., BARAI V. N., LYAKHOVETS V. I.,
KULAK T. I.*, KVASYUK E. I.*, MIKHAILOPULO I. A.*

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR;

* *Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

The microbiological transribosylation of the natural cytokinine, 6-benzylaminopurine by means of *Escherichia coli* BM-11 cells has been studied, with uridine as a donor of D-ribofuranose. Optimal conditions of the transribosylation reaction were found. The 2,3-di-O-(2-carboxyethyl)ethylidene derivative of 6-benzylaminopurine-9-yl riboside was synthesized and used as a ligand for the preparation of an affinity sorbent via its coupling with aminohexyl-Sepharose 4B. Capacity of the resultant affinity sorbent was 1,5 mol of the ligand per 1 ml of the swollen gel or 6,0 mol per 1 ml of dry gel.