



УДК 577.164.131.048 + 577.158.45

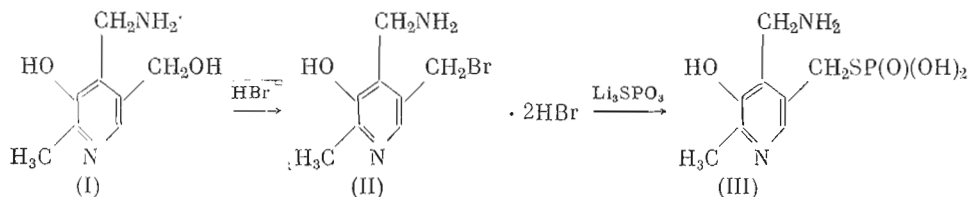
СИНТЕЗ ТИОФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ СОЕДИНЕНИЙ  
ГРУППЫ ВИТАМИНА В<sub>6</sub>*Хурс Е. Н., Метцлер Д. Е., Хомутов Р. М.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;  
Департамент биохимии и биофизики университета в Эймсе, Айова, США*

Синтезированы тиофосфорные эфиры группы витамина В<sub>6</sub>, D, L- и L-N<sup>α</sup>-(пиридоксил-5'-тиофосфат)глутаминовые кислоты, а также соответствующие [<sup>32</sup>P]-меченые соединения. Изучено взаимодействие этих веществ с апоаспартаттрансаминазой. Высказано предположение, что расщепление тиофосфатной связи аналогов в ходе ферментативной реакции связано с изменением строения и специфичности участка активного центра, фиксирующего фосфоэфирный фрагмент кофермента, по координате ферментативной реакции.

Соединения группы витамина В<sub>6</sub>, как известно, могут функционировать в качестве коферментов только в виде 5'-фосфорных эфиров. Фосфатная группа обеспечивает не только прочное и специфическое связывание кофермента с белком, но, вероятно, и эффективное протекание реакций в активном центре [1]. С целью выяснения конкретных динамических функций фосфатной группы, важных для понимания механизма действия пиридоксальных ферментов, был предпринят синтез неизвестных ранее 5'-тиофосфорных эфиров пиридоксамина и пиридоксаля и исследовано взаимодействие этих аналогов кофермента, содержащих активированную фосфоэфирную связь с апоаспартаттрансаминазой.

Для получения 5'-тиофосфорных эфиров соединений группы В<sub>6</sub> можно было использовать фосфорилирование соответствующих тиолов, из которых описан только 5'-пиридокстиол [2], или алкилирование солей тиофосфорной кислоты производными с подходящими заместителями в положении 5. В обоих случаях наиболее сложной была проблема защитных групп, что связано как с полифункциональностью соединений В<sub>6</sub>, так и с лабильностью тиофосфатной связи. Поэтому наши усилия были сосредоточены на поисках более простых вариантов, пригодных, в частности, для получения меченных по фосфору соединений.

Синтез пиридоксамин-5'-тиофосфата (III) осуществлен по следующей схеме:



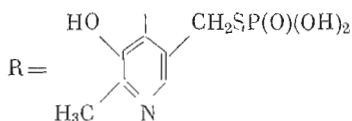
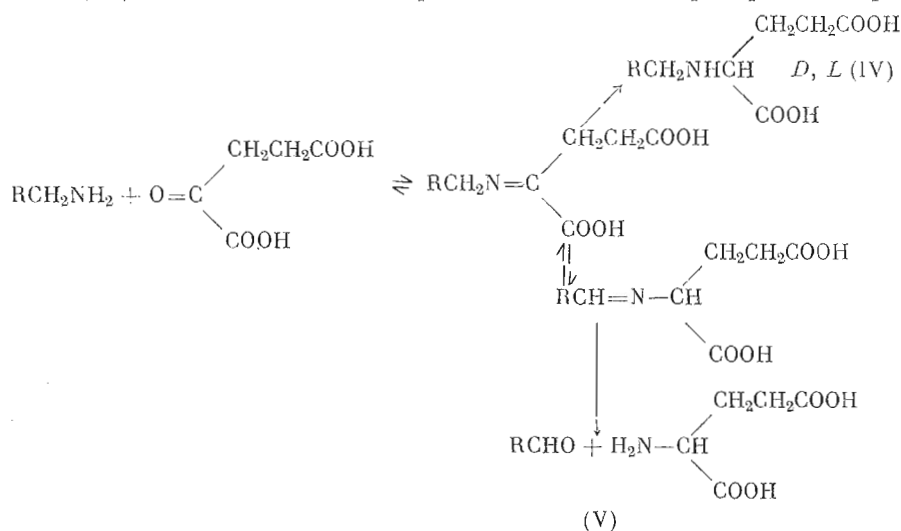
Кратковременное нагревание пиридоксамина (I) с концентрированной бромистоводородной кислотой приводило с высоким выходом к 5'-дезоксипиридоксамину (II), выделенному в виде дибромгидрата. Критической стадией синтеза была реакция бромидов (II) с тиофосфатом лития, так как бромпиридоксамин (II), устойчивый в кислых растворах, при нейтральных и щелочных pH, при которых обычно проводится тиофосфорилирование [3], быстро полимеризовался. Оказалось, однако, что в водных или водно-диметилформамидных растворах при 20° алкилирование протекало быстро и приводило к тиофосфату (III) с хорошим выходом.

Тиофосфат пиридоксамина (III) однороден при хроматографии в тонком слое и электрофорезе и подобно пиридоксамин-5'-фосфату давал характерные реакции с нингидрином, 2,6-дихлорхинонхлориминном и молибдатом аммония. В кислых растворах он аналогично другим тиофосфатам быстро гидролизовался до 5'-дезоксипиридоксамина.

Синтез  $[^{32}\text{P}]$ -(III) осуществлен по вышеприведенной схеме с использованием  $[^{32}\text{P}]$ тиофосфата лития, который получался из гидроксида лития и  $[^{32}\text{P}]$ тиофосфорилхлорида



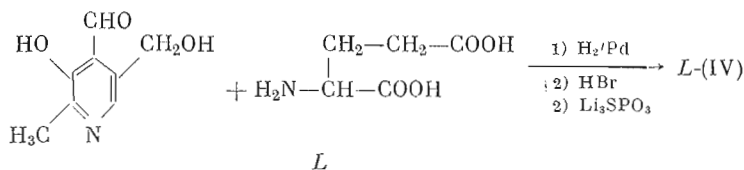
Для дальнейших исследований свойств тиофосфата (III) как кофермента трансаминаз важно было выяснить поведение его в модельной реакции переаминирования. Подобно пиридоксамин-5'-фосфату тиофосфат (III) реагировал в спиртовых растворах щелочей с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, образуя кетимин, о чем свидетельствовали типичные изменения в УФ-спектре и выделение *D,L*- $\text{N}^\alpha$ -(пиридоксил-5'-тиофосфат)глутаминовой кислоты (IV) после восстановления реакционной смеси боргидридом натрия.



Прототропная перегруппировка кетимина в альдимин осложнялась частичным расщеплением тиофосфатной связи и приводила к сложной смеси, из которой удалось выделить пиридоксаль-5'-тиофосфат (V). Попытки синтеза последнего другими методами были неудачны, и реакция переаминирования оказалась единственным способом получения альдегида (V), хотя и с малым выходом.

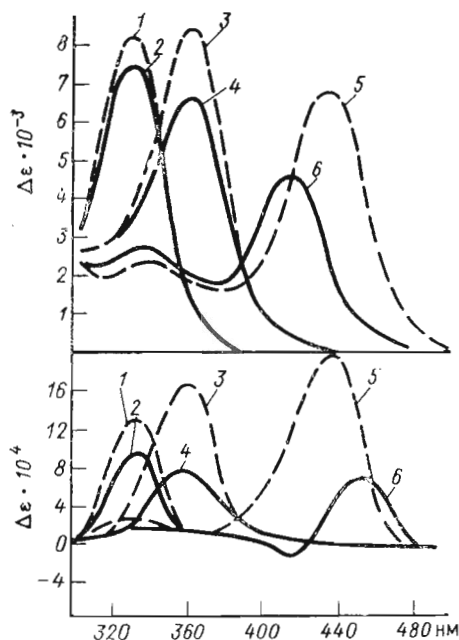
Ранее было показано, что *L*- $\text{N}^\alpha$ -(пиридоксил-5'-фосфат)глутаминовая кислота является необратимым ингибитором аспартаттрансферазы,

причем в определенных условиях взаимодействие ингибитора с ферментом приводило к фосфорилированию групп активного центра [4]. Можно было ожидать, что аналогичными, но более выраженными свойствами будет обладать и *L*-изомер соединения (IV). Для его получения *L*- $N^{\alpha}$ -(пиридоксил)глутаминовую кислоту переводили, как описано выше, в соответствующее 5-Br-производное, которое в результате реакции с тиофосфатом лития давало *L*-изомер (IV):



Синтез *L*-изомера [ $^{32}\text{P}$ ]-IV был осуществлен аналогичным образом с использованием [ $^{32}\text{P}$ ]тиофосфата лития.

Исходным соединением в синтезе пиридоксал-5'-тиофосфата (VI) было изопронилиденное производное 5'-дезоксис-5'-хлорпиридоксола, реакция которого с тиофосфатом лития протекала ожидаемым образом. Однако при удалении в кислых условиях изопронилиденной защитной группы происходил и гидролиз тиофосфатной связи. Поэтому для получения пиридоксола (VI) изопронилиденное производное сначала переводилось в 5'-дезоксис-5'-хлорпиридоксол, который вводился в реакцию с тиофосфатом лития. При кратковременном нагревании в кислых растворах тиофосфат (VI) легко превращался в 5'-пиридокстиол [2].



УФ- и КД-спектры эквимольных комплексов с апоферментом при pH 8,2: 1 — пиридоксамин-5'-фосфата, 2 — пиридоксамин-5'-тиофосфата, 3 — пиридоксаль-5'-фосфата, 4 — пиридоксаль-5'-тиофосфата; при pH 5,0: 5 — пиридоксаль-5'-фосфата, 6 — пиридоксаль-5'-тиофосфата

Исследование коферментных свойств 5'-тиофосфорных эфиров проводилось на аспартаттрансаминазе из сердца свиньи. Взаимодействие эквимольных количеств апофермента и тиоэфира (III) приводило к образованию комплекса, свойства которого были весьма близки к свойствам обычной аминокислотной формы фермента (рисунок). Кратковременное воздействие избытка  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты превращало комплекс в пиридоксалиден-5'-тиофосфатную форму трансаминазы, которая по ряду параметров (стабильность, обратимые изменения УФ-спектра при изменении pH, превращение в аминокислотную форму при действии аспартата или глутамата и т. д.) была сходна с альдегидной формой фермента. Вместе с тем наблюдались отчетливые различия в УФ- и КД-спектрах (рисунок). Активность фермента, реконструированного тиофосфорными эфирами, составляла 10—15% активности нативной трансаминазы, тогда как коферментные свойства у многочисленных известных аналогов пиридоксаль- или пиридоксамин-5'-фосфатов либо полностью отсутствовали, либо, как в случае наиболее близкого пиридоксаль-5'-фосфату фосфонатного аналога, были слабо выражены (несколько процентов) [5].

При инкубации пиридоксамин-5'-тиофосфатной формы трансаминазы с субстратной смесью в течение нескольких часов при pH 5 отщеплялось ~ 30% дефосфорилированного хромофора, а фосфат оставался связанным с белком. На стадии промежуточных фермент-субстратных комплексов наблюдались и наибольшие различия в УФ- и КД-спектрах между нативной трансаминазой и ферментом, реконструированным тиофосфорными эфирами. Комплекс апофермента с аналогом промежуточных кофермент-субстратных соединений, *L*-N<sup>α</sup>-(пиридоксил-5'-тиофосфат)глутаминовой кислотой, устойчивый при нейтральных и слабощелочных pH, быстро терял дефосфорилированный хромофор при слабокислых pH, причем фосфат оставался связанным с белком, трансаминазная активность которого не восстанавливалась после добавления пиридоксаль-5'-фосфата.

Таким образом, замена в молекуле кофермента фосфатной группы на тиофосфатную практически не сказывалась на свойствах соответствующей аминокислотной формы фермента, вносила определенные изменения в характеристику альдегидной формы и существенным образом влияла на свойства фермент-субстратных комплексов, приводя в последнем случае к разрыву тиофосфатной связи в ходе ферментативной реакции\*.

Эти данные подтверждали высказывавшееся ранее предположение о том, что участок активного центра, фиксирующий фосфатсодержащий фрагмент кофермента («фосфорилсвязывающий» участок), изменяет свое строение по координате реакции, становясь строго специфичным в процессе образования фермент-субстратных комплексов, и что эти изменения являются определяющими для эффективного участия кофермента в функционировании активного центра. С точки зрения принятого сейчас представления о подвижности кофермента в активном центре фермента это означало, что изменения строения фосфорилсвязывающего участка по координате реакции необходимы для правильной ориентации кофермент-субстратных соединений относительно каталитических групп и что перемещения кофермента в активном центре вряд ли могут быть описаны как вращение по оси C<sub>2</sub>—C<sub>5</sub> [7], при котором фосфорилсвязывающему участку отводилась роль пассивного якоря.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры снимались на приборе Specord UV-VIS (ГДР), ДОВ и КД-спектры — на приборе Jouan II (Франция). Спектры ПМР получены на приборе BS 487C (ЧССР). Радиоактивность измеряли на счетчике SL-30 Intertechnique (Франция). Регистрацию поглощения элюата при 206 и 340 нм проводили с помощью проточного денситометра Uvicord III (Швеция). ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР), система — 0,2% водный аммиак. Электрофорез проводили на бумаге Whatman № 1 и № 3 (Англия) при градиенте напряжения 80—100 В/см в буферах А — pH 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1:10:189) и Б — pH 6,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 33:1:300). Вещества обнаруживали по поглощению в УФ-свете, реакцией с вингидрином, молибдатом аммония и 2,6-дихлорхинонхлориминном.

*Пиридоксамин-5'-тиофосфат (III)*. Раствор 1,2 г (5 ммоль) дихлоргидрата пиридоксамин (I) в 40 мл 48% HBr кипятили в течение 1 ч. Затем упаривали в вакууме до начала кристаллизации, нагревали до растворения кристаллов и добавляли 40 мл горячей уксусной кислоты. Спустя 12 ч при 0° осадок отделяли, промывали уксусной кислотой, ацетоном и сушили в вакууме. Выход бромида (II) 1,3 г (60%). В раствор 0,44 г (2 ммоль) пентагидрата тиофосфата лития в 5 мл H<sub>2</sub>O при хорошем перемешивании вносили 0,91 г (2,3 ммоль) бромида (II). Спустя 30 мин,

\* Известны также случаи лабильности и распада фосфатной связи для аспаргат-трансаминазы [4] и декарбоксилазы глутаминовой кислоты [6].

когда проба с  $\text{AgNO}_3$  на сульфид-ион стала отрицательной, добавляли 15 мл абс. этилового спирта, отфильтровывали осадок, промывали его спиртом, кристаллизовали несколько раз из водного раствора аммиака и сушили в вакууме над КОН. Выход тиофосфата (III) 0,55 г (90%).  $E \cdot 10^3$ ,  $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ : — 2,8 (А), — 1,7 (Б);  $R_f$  0,87; УФ,  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}7}$  330 нм,  $\epsilon$  9600; ПМР,  $\delta$  в  $\text{D}_2\text{O} \times \text{NaOD}$ ,  $\rho\text{D}7$ , м. д.: 2,86 (2- $\text{CH}_3$ ), 4,37 и 4,46 (5'- $\text{CH}_2$ ), 4,85 (4'- $\text{CH}_2$ ), 8,12 (6-Н). Найдено, %: С 36,34; Н 5,02; N 10,43; P 11,45; S 12,49.  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4\text{PS}$ . Вычислено, %: С 36,36; Н 4,92; N10,52; P 11,73; S 12,13.

Раствор тиофосфата (III) в небольшом избытке 6 н.  $\text{HCl}$  нагревали несколько минут, добавляли избыток горячего изопропанола и после завершения кристаллизации получали дихлоргидрат 5'-дезоксипиридоксамина. Выход 95%.  $E \cdot 10^3$ ,  $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ : +10,9 (А), +6,4 (Б);  $R_f$  0,14; УФ,  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}7}$  325 нм,  $\epsilon$  9100. Найдено, %: С 37,10; Н 5,40; N 10,45.  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{HCl}$ . Вычислено, %: С 37,35; Н 5,44; N 10,89.

[ $^{32}\text{P}$ ]Пиридоксамин-5'-тиофосфат. К остатку после высушивания 0,23 мл водного раствора [ $^{32}\text{P}$ ]фосфорной кислоты (10 мКи) добавляли 0,17 г (1 ммоль) тиофосфорилхлорида и нагревали в ампуле 65 ч при 160—170°. После охлаждения прибавляли 1,5 мл водного раствора  $\text{LiOH}$  (0,28 г, 6,6 ммоль) и встряхивали 30 мин при 85—90°. Охлаждали, центрифугировали, супернатант смешивали с 5 мл спирта, осадок отфильтровывали, промывали спиртом и сушили в вакууме над КОН. Выход пентагидрата [ $^{32}\text{P}$ ]тиофосфата лития 100 мг (45%). Из 100 мг [ $^{32}\text{P}$ ]тиофосфата лития и 220 мг бромида (II), как описано выше, получен меченый тиофосфат (III). Активность 0,2 мКи/ммоль. При хроматографии в тонком слое область максимальной радиоактивности совпадала с положением немеченого тиофосфата.

*D,L-N $\alpha$ -(пиридоксил-5'-тиофосфат)глутаминовая кислота (IV)*. К раствору 254 мг (1 ммоль) тиофосфата (III) в 5 мл 0,96 М метанольного раствора КОН добавляли порциями 146 мг (1 ммоль)  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и перемешивали 1 ч при 20°. В образовавшийся ярко-желтый раствор вносили порциями в течение 1 ч и при хорошем перемешивании 34 мг (0,9 ммоль)  $\text{NaNH}_4$ . Бесцветную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток дважды очищали препаративным электрофорезом на бумаге. Выход 100—150 мг (30%).  $E \cdot 10^3$ ,  $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ : —4,8 (А), —4,1 (Б). Найдено, %: С 37,54; Н 5,27; N 7,10; P 7,88; S 7,67.  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8\text{PS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 37,72; Н 5,32; N 6,77; P 7,50; S 7,74.

*Пиридоксаль-5'-тиофосфат (V)*. К раствору 1 ммоль тиофосфата пиридоксамина (III) в 5 мл 0,96 М метанольного раствора КОН прибавляли порциями 1 ммоль  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и перемешивали в темноте 24 ч при 20°. Затем упаривали в вакууме досуха, растворяли в минимальном количестве воды, подкисляли уксусной кислотой до рН 3,5 и проводили препаративный электрофорез на бумаге, используя в качестве маркера пиридоксаль-5'-фосфат. После второй очистки получали пиридоксаль (V) в виде ярко-желтого порошка.  $E \cdot 10^3$ ,  $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ : —7,8 (А), —5,1 (Б);  $R_f$  0,92; УФ,  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}7}$ , нм ( $\epsilon$ ): 330 (3200), 388 (6100).

*L-N $\alpha$ -(пиридоксил-5'-тиофосфат) глутаминовая кислота (L-IV)*. Раствор 1 ммоль *L*-глутаминовой кислоты и 1 ммоль пиридоксаля в 5 мл 0,4 М метанольного раствора КОН после гидрирования над Pt-чернью фильтровали, фильтрат упаривали досуха и остаток очищали на карбоксильной смоле XE-64 ( $\text{H}^+$ -форма, элюция водой). Фракции, обладающие поглощением при 206 и 340 нм, лиофилизировали и остаток нагревали 15 мин с 10 мл 48%  $\text{HBr}$ . Смесь упаривали в вакууме, растворяли в 2 мл 50% этилового спирта, 1 М раствором  $\text{LiOH}$  доводили до рН 2,5—3,1, к раствору сразу прибавляли 0,7 ммоль тиофосфата лития в смеси 0,7 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и 0,2 мл диметилформамида. Спустя 1 ч смесь упаривали при 20° досуха, остаток растирали с абс. этиловым спиртом, фильтровали, остаток промывали

спиртом, эфиром, сушили в вакууме над КОН. Выход *L*-изомера (IV) 150—170 мг (40%), очистка препаративным электрофорезом давала гомогенное вещество с  $[\alpha]_D^{23} +32$  (с 0,5; 0,1 н. HCl).

•  $[^{32}P]L-N^\alpha$ -(пиридоксил-5'-тиофосфат)глутаминовая кислота получена аналогично предыдущему с использованием  $[^{32}P]$ тиофосфата лития. Уд. акт. 0,3 мКи/ммоль.

*Пиридоксол-5'-тиофосфат* (VI). Раствор 1,3 г (5 ммоль) хлоргидрата изопропилиденового производного 5'-дезоксипиридоксола в смеси 50 мл абс. этилового спирта и 2 мл конц. HCl кипятят 30 мин и после упаривания в вакууме досуха и высушивания получают 1 г (90%) хлоргидрата 5'-дезоксипиридоксола. Раствор 125 мг (0,55 ммоль) последнего в смеси 0,6 мл диметилформамида и 0,3 мл воды прибавляли по каплям при перемешивании к раствору 115 мг (0,5 ммоль) тиофосфата лития в 1 мл воды. Спустя 2 ч при 20° добавляли 2 мл этилового спирта, перемешивали 10 мин, осадок отфильтровывали, промывали спиртом и сушили в вакууме над КОН. Выход литиевой соли (VI) 100—120 мг.  $R_f$  0,90; УФ,  $\lambda_{\max}$ , нм ( $\epsilon$ ): pH 7—325 (7650); 0,1 н. NaOH—310 (7300). В результате гидролиза тиофосфата (VI) в условиях, аналогичных гидролизу соединения (III), был получен 5'-пиридокстиол, т. пл. 180—183° [2].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1973) *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 9, pp. 379—481.
2. Paul B., Karytnyk W. (1969) *Tetrahedron*, 25, 1071—1077.
3. Akerfeld S. (1960) *Acta chem. scand.*, 14, 1980—1984.
4. Хурс Е. Н., Северин Е. С., Диксон Г. Б., Хомутов Р. М. (1976) *Молекулярн. биология*, 10, 897—906.
5. Hullar T. L. (1969) *J. Med. Chem.*, 12, 58—63.
6. Sastchenko L. P., Severin E. S., Metzler D. E., Khomutov R. M. (1971) *Biochemistry*, 10, 4888—4893.
7. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969) *Advan. Enzymol.*, 32, 21—52.

Поступила в редакцию  
13.III.1978

#### SYNTHESIS OF THIOPHOSPHATE ESTERS OF COMPOUNDS OF VITAMIN B<sub>6</sub> SERIES

KHURS E. N., METZLER D. E., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow, and Department of Biochemistry and Biophysics,  
Iowa State University, Ames, USA*

Thiophosphate esters of some representatives of vitamin B<sub>6</sub> group were synthesized, i.e. *D,L*- and *L-N*<sup>α</sup>-(pyridoxyl-5'-thiophosphate)glutamic acid, and also the corresponding <sup>32</sup>P-labeled compounds. The results on the interaction of these substances with apo-aspartateaminotransferase were discussed and it was proposed that the enzymatic cleavage of the thiophosphate bond in analogs is associated with the changes, occurring along the reaction coordinate in structure and specificity of the active site region anchoring the phosphoester fragment of the coenzyme.