



УДК 547.963.32.07 + 577.159

ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ7. АМИНОФОСФОНИЛАДЕНИЛАТЫ — НОВЫЙ ТИП АНАЛОГОВ  
ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ В СИНТЕТАЗНОЙ РЕАКЦИИ  
И ЭФФЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ АМИНОАЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗ\**Холутов Р. М., Осипова Т. И., Вирюков А. И.,  
Ишмуратов Б. Х.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

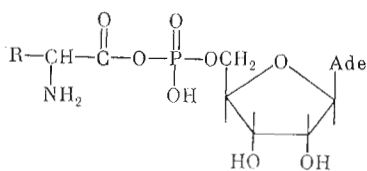
Синтезированы аминофосфониладенилаты — новый тип аналогов переходного состояния в синтетазной реакции. Разработаны методы синтеза таких фосфорорганических аналогов аминокислотаденилатов. Показано, что они являются сильными и специфическими ингибиторами аминокислот-ТРНК-синтетаз.

Несмотря на значительный прогресс в исследовании аминокислот-ТРНК-синтетаз, проблема регулирования активности этих ключевых ферментов биосинтеза белка до сих пор недостаточно развита, что, по-видимому, обусловлено высокой сложностью системы. Большая часть известных ингибиторов синтетаз (производные и аналоги аминокислот, АТР, АМР) была получена в ходе исследования субстратной специфичности этих ферментов и обладала невысоким средством и малой избирательностью. Аминоалкиловые эфиры АМР оказались единственным типом сильных и селективных ингибиторов синтетаз [2], проявивших к тому же антибактериальную активность [3].

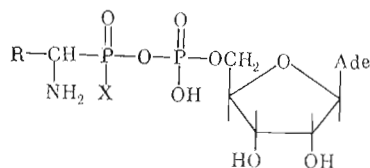
Учитывая важность исследования механизма действия и регулирования синтетаз, актуальной задачей представлялся поиск новых типов веществ, сочетающих высокое сродство к ферментам с достаточной реакционной способностью. При этом целесообразным казался путь получения аналогов переходного состояния, на перспективность которого для эффективного ингибирования ферментов одним из первых обратил внимание Дженкс [4]. Независимо было предложено использовать в случае пиридоксаль-сальных ферментов аналоги промежуточных кофермент-субстратных соединений, N<sup>α</sup>-(пиридоксил-5'-фосфат)аминокислоты [5, 6], с помощью которых выяснялся вопрос о функциях фосфатной группы пиридоксаль-5'-фосфата в ферментативной реакции [7]. В дальнейшем указанный подход получил значительное развитие [8].

Так как основными промежуточными соединениями в синтетазной реакции являются аминокислотаденилаты (I), в качестве аналогов их переходного состояния мы предлагаем использовать смешанные ангидриды α-аминофосфоновых кислот и АМР (II).

\* Сообщение 6 см. [1].



(I)



(IIa-r)

- а: R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; X = OH  
 б: R = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; X = OH  
 в: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>; X = OH  
 г: R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; X = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

При синтезе смешанных ангидридов АМР и фосфоновых кислот ключевой стадией является образование ангидридной связи. Среди известных методов получения несимметричных пирофосфатов одним из наиболее удобных оказался способ, предусматривавший предварительную активацию фосфорильной группы одного из компонентов в виде имидазолида. В первом варианте имидазолид АМР вводился в конденсацию с N-защипными α-аминофосфовыми кислотами. В качестве защитной была выбрана карбобензилоксигруппа, так как удаление ее осуществляется в достаточно мягких условиях без затрагивания лабильной ангидридной связи. Следует отметить, что значительный распад последней наблюдался, если гидролиз проводился в среде гидроксилсодержащего растворителя, и был минимальным в растворе абс. диметилформамида.

Помимо (IIa) и (IIб) аналогичным образом были получены смешанные ангидриды, метил-, изобутил-, изобутирилфосфовых кислот и АМР соответственно (IIIa)\*, (IIIб) и (IIIв).

Во втором варианте с помощью карбонилдиимдазола активировалась аминокислотная группа.

Хотя сами α-аминофосфовые кислоты из-за плохой растворимости не реагировали в органических растворителях с карбонилдиимдазолом, их трифторацетаты в растворе диметилформамида быстро давали соответствующие имидазолиды, которые без выделения вводились в реакцию с триоктиламмониевой солью АМР. Выходы смешанных ангидридов (II) в этом случае были ниже, преимущество заключалось в возможности использования незащипленных по аминокислотной группе аминокислот.

Известно, что конденсация двух различных моноэфиров фосфорной кислоты под влиянием дициклогексилкарбодиимида обычно приводит к смеси всех возможных пирофосфатов. Однако, когда один из компонентов отличается по кислотности, наблюдается преимущественное образование несимметричного пирофосфата [10]. При взаимодействии аминокислот и АМР под действием дициклогексилкарбодиимида в среде водного пиридина, содержащего соляную кислоту, не отмечалось образования ангидридов аминокислотных кислот и выходы смешанных ангидридов (IIa, в) составляли 17—24%.

При поисках путей синтеза ангидрида моноэтилового эфира α-аминоизобутилфосфоновой кислоты и АМР (IIг) учитывалось, что по реакционной способности моноэфиры фосфовых кислот напоминают диэфиры фосфорной кислоты, для активации которых требуется достаточно энергичное воздействие (сульфохлориды, карбодиимиды при повышенных температурах и т. п.). Использование подобных агентов подразумевало дополнительные стадии, связанные с защитой имеющихся функциональных групп, что ставило новые проблемы, обусловленные лабильностью ангид-

\* Ангидрид (IIIa) был получен ранее взаимодействием амида АМР и метилфосфоновой кислоты [9].

Таблица 1

## Выходы и некоторые свойства синтезированных соединений

Вещество	Метод синтеза	Выход, %	$R_{AMP}$	$E_{AMP}$	$\lambda_{max}$ , нм
(IIa)	1, 2, 3	55, 26, 24	—	+0,76	260
(IIб)	1, 2	50, 35	—	+0,76	260
(IIв)	3	17	—	+0,76	260
(IIг)	4	51	—	-1	260
(IIIб)	1	62	3,26	—	260
(IIIв)	1	57	2,80	—	260

Таблица 2

Ингибирование ( $K_i$ ,  $M^{-1}$ ) аминокил-тРНК-синтетаз фосфониладенилатами (II) и (III)

Вещества	Синтетазы					
	Валил-		Фенилаланил-		Метионил-	
	А *	Б	А	Б	А	Б
(IIa)	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$2,8 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$
(IIб)	$5,1 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$
(IIв)	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$
(IIг)	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	—
(IIIб)	$9,3 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	—	—	—	—
(IIIв)	$4,4 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	—	—	—	—
Карбобенз- окси (IIб)	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$

\* А — реакция АТР — РР<sub>1</sub>-обмена; Б — реакция аминокилирования тРНК.

ридной связи. Эти трудности удалось обойти благодаря использованию фосгена для активации фосфонильной группы. При обработке моноэтилового эфира  $\alpha$ -аминоизобутилфосфоновой кислоты фосгеном в среде абс. диоксана происходило, по-видимому, образование монохлорангидрида, который без выделения вводился в реакцию с АМР, что непосредственно приводило к ангидриду (IIг) с выходом 40%.

Строение полученных смешанных ангидридов (II) (табл. 1) доказывалось на примере соединения (IIa), синтезированного тремя способами. Оно было гомогенным при электрофорезе в разных системах, и при рН 4,1 подвижность его отличалась от АМР и  $\alpha$ -аминоизобутилфосфоновой кислоты. УФ-спектр соответствовал незамещенному аденозину. Вещество окислялось периодатом натрия, что подтверждало наличие свободной гликольевой группировки. На хроматограммах соответствующее УФ-поглощающее пятно окрашивалось нингидрином. При гидролизе соединения (IIa) (100°, 10 мин, 1 н. HCl) единственными продуктами были АМР и  $\alpha$ -аминоизобутилфосфоновая кислота.

Для ферментативных испытаний важное значение имела устойчивость аналогов (II). Выше уже упоминалось об их распаде при гидролизе соответствующих производных. Аналогичное явление наблюдалось и при ионообменной хроматографии. Сравнение устойчивости соединений (IIa) и (IIIa) показало явное влияние аминокислотной группы на лабильность ангидридной связи (времена полураспада при рН 1, 7, 8 и 12 составили для ангидрида (IIa), 6, 6 и 3 ч; для ангидрида (IIIa) — 48, 48 и 48 ч соответственно).

С этим согласовывалось также и значительное ослабление ингибиторных свойств аналога (IIa) и особенно (IIб) в отношении синтетаз (см. ниже) после инкубации в течение нескольких часов при pH 7,8 трис-HCl-буферов.

Энзимологические эксперименты, подробное описание которых публикуется в отдельном сообщении, проводились с очищенными препаратами валил-, фенилаланил- и метионил-tРНК-синтетаз из *E. coli* В. Исследовалось влияние различных фосфониладенилатов (II) и (III) на реакции АТР—PP<sub>i</sub>-обмена и аминокислотирования tРНК, катализируемые этими ферментами.

Как видно из данных табл. 2, синтезированные аналоги (II), подобные по строению определенным аминокислотаденилатам (I), оказались сильными и избирательными ингибиторами в реакциях АТР — PP<sub>i</sub>-обмена и аминокислотирования tРНК. Специфичность строения аминокислотаденилатов (II) как аналогов аминокислотаденилатов (I) следовала не только из факта слабого ингибирования «чужого» фермента (разница в несколько порядков), но и значительного ослабления торможения при изменении строения аминокислотаденилатов (II). Замена гидроксильной группы на этоксилильную у фосфора аминокислотаденилатного фрагмента лишь незначительно снижала ингибирование (см. соединения (IIa) и (IIr)). Торможение аминокислотаденилатами (II) было конкурентным по отношению к обоим субстратам, аминокислоте и АТР, что свидетельствовало о связывании ингибитора непосредственно в активном центре фермента.

Выше уже отмечалась лабильность ангидридной связи в соединениях (II). Известно также, что ангидрид СМР и β-аминоэтилфосфоновой кислоты способен подобно субстрату, цитидиндифосфозаноламину, ферментативно фосфонилировать гидроксильную группу диглицерида с образованием соответствующего фосфолипида [11]. Применительно к ангидридам (II) и синтетазам это означало вероятность таких реакций, как ферментативный гидролиз Р—О—Р-связи, аминокислотирование групп активного центра, взаимодействие с неорганическим пирофосфатом с образованием АТР или аминокислотирования tРНК.

Эти возможности были проверены экспериментально. Так, степень ингибирования валил-tРНК-синтетазы аналогом (IIa) не изменялась во времени и торможение снималось добавлением избытка валина. Следовательно, ингибирование было обратимым, не затрагивало групп активного центра, как и в известном аналогичном случае с диязопропилфторфосфатом [12], и не сопровождалось гидролизом аналога. Фермент не катализировал пирофосфоролит, так как при инкубации с синтетазой и <sup>32</sup>PP<sub>i</sub> не было обнаружено АТ<sup>32</sup>Р. Наконец, в опытах с ангидридом <sup>3</sup>H<sub>α</sub>-α-аминоизобутилфосфоновой кислоты и АМР было показано, что в стандартных условиях ферментативного аминокислотирования не наблюдалось включения метки в tРНК, т. е. не происходило аминокислотирование последней. Эти результаты не могли быть связаны с неустойчивостью аминокислотаденилат-tРНК, поскольку полученное нами модельное соединение, 2'(3')-O-(α-аминоизобутилфосфонил)-аденозин-5'-фосфат [13], было стабильно в условиях эксперимента. Аналогичная картина торможения наблюдалась и в случае других смешанных ангидридов (II), также оказавшихся конкурентными! обратимыми ингибиторами, ангидридная связь которых была пассивна в катализируемых синтетазой реакциях.

При анализе особенностей аналогов (II) как ингибиторов синтетаз следовало учитывать, что являющиеся их составной частью аминокислотаденилатные кислоты не были субстратами синтетаз, а их ингибирующий эффект наблюдался при концентрациях 10<sup>-2</sup> М и выше\*, т. е. сродство к синтетазам было такого же порядка, что и несубстратных аминокислот. Для аде-

\* Исключением была α-амино-β-фенилэтилфосфоновая кислота с K<sub>i</sub>10<sup>-4</sup> М в отношении фенилаланинового фермента, тем не менее по ингибиторным свойствам соединение (IIб) не отличалось от других аналогов.



обычно протекают через промежуточное образование ациладенилатов или ацилфосфатов. Как показано в этой работе на конкретном примере аминок-ацил-тРНК-синтезас, специфическими и эффективными ингибиторами подобных ферментов могут быть ангидриды соответствующих фосфоновых кислот и АМР или фосфата, что представляет интерес не только для изучения механизма действия ферментов, но и для направленного регулирования их активности.

### Экспериментальная часть

Пиридин и диметилформамид, очищенные и высушенные обычными способами, хранили над гидридом кальция. Метил- и изобутилфосфоновые кислоты синтезированы согласно методике работы [16]. Способ получения  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот и их производных описан в работе [17],  $\alpha$ -изобутирилфосфоновой кислоты — в работе [18], три-*n*-октиламмониевой соли и имидазолида АМР — в работе [19]. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV<sub>254</sub>, хроматографию — на бумаге FN-18, силикагеле ЛСЛ<sub>254</sub>, 5/40 мк в системе А — изопропанол — 25% аммиак — вода (7 : 1 : 2). Электрофорез вели на бумаге FN-18 в системе Б — 0,05 М ацетатный буфер, рН 4,1 (напряжение 4000 В). Обнаружение пятен осуществляли в УФ-свете обработкой нингидрином и молибдатом аммония. Окисление периодатом натрия делалось по методике [20]. Спектры снимались на приборе Specord UV VIS (ГДР), буфер трис-HCl, рН 7,8, количественное определение веществ на хроматограммах — на приборе Orton (ФРГ), радиоактивность просчитывали на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция).

*Ангидриды АМР и фосфоновых кислот (II) и (III). Метод 1.* К раствору 0,5 ммоль три-*n*-октиламмониевой соли имидазолида АМР в 3 мл диметилформамида прибавляли 0,5 ммоль фосфоновой кислоты в 3 мл диметилформамида, оставляли при 20° на 24 ч, затем упаривали при 40° в вакууме досуха. Оставшееся масло растирали с 1 мл изопропанола, затем постепенно прибавляли эфир до объема 5 мл, образовавшийся осадок быстро отфильтровывали и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Смесь очищали препаративной ТСХ, ангидриды АМР и фосфоновых кислот элюировали 2% раствором триэтиламина в метаноле, затем элюаты упаривали в вакууме досуха. В случае (IIIa—в) остаток растворяли в 1 мл метанола, добавляли 2,2 ммоль перхлората натрия в метаноле, образовавшуюся натриевую соль отфильтровывали, промывали спиртом, эфиром и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Триэтиламмониевую соль N <sup>$\alpha$</sup> -карбобензилоксипроизводного (IIa) или (IIб) смешивали с раствором 2,2 ммоль три-*n*-октиламина в диметилформамиде, смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 2 мл диметилформамида, фильтровали и гидрировали в течение 3—5 ч над 50—70 мг палладиевой черни, промытой предварительно диметилформамидом. Затем отфильтровывали катализатор, фильтрат упаривали в вакууме при 40°, масло растирали с изопропанолом и эфиром, осадок отделяли и высушивали в вакууме. Превращение в натриевую соль осуществлялось аналогично вышеописанному. После препаративного электрофореза соединения (IIa) или (IIб) элюировали водой при 4°, затем лиофилизировали, остаток размешивали с абс. спиртом, отделяли центрифугированием и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

*Метод 2.* К 0,5 ммоль  $\alpha$ -аминофосфоновой кислоты прибавляли 1 ммоль трифторуксусной кислоты, размешивали до образования сиропа и добавляли раствор 1 ммоль карбонилдимидазола в 0,5 мл диметилформамида. Спустя 2 ч прибавляли раствор 0,5 ммоль три-*n*-октиламмониевой соли АМР в 1,5 мл диметилформамида и оставляли перемешиваться 24 ч при 20°. Образовавшийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме при 40°, масло обрабатывали изопропанолом и эфиром, осадок отделяли и высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Превращение в натриевую соль и очистку электрофорезом проводили как описано выше.

*Метод 3.* Смесь 0,5 ммоль  $\alpha$ -аминофосфоновой кислоты и 0,5 ммоль АМР суспендировали в 1,2 мл 1 н. соляной кислоты, добавляли 5 мл пиридина, перемешивали 15 мин, а затем прибавляли раствор 10 ммоль диглицерилкарбодиимида в 8 мл пиридина. Перемешивали 24—30 ч при 20—25°, фильтровали, осадок промывали пиридином (2 × 3 мл) и водой (3 × 3 мл). Фильтраты упаривали в вакууме досуха, добавляли 5 мл воды, фильтровали, извлекали эфиром (3 × 5 мл). Водную часть размешивали 10 мин с 0,1 г активированного угля, который отфильтровывали, промывали 100 мл воды и элюировали 2% раствором триэтиламина в метаноле. Элюаты упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в метаноле, фильтровали через целит. Превращение в натриевую соль и очистку электрофорезом проводили так, как описано выше.

*Метод 4.* В суспензию 0,25 ммоль моноэтилового эфира  $\alpha$ -аминоизобутилфосфоновой кислоты\* в 3 мл сухого диоксиана пропускали фосген до полного растворения (несколько минут), затем раствор продували аргоном и после упаривания в вакууме досуха получали вязкое масло, которое растворяли в 3 мл диметилформамида, смешивали с раствором 0,2 ммоль три-*n*-октиламмониевой соли АМР в 3 мл диметилформамида и спустя 2 ч раствор упаривали в вакууме при 40°. Остаток очищали препаративной восходящей ТСХ, на силикагеле в системе А. Зону с  $R_f$  0,43 элюировали этанолом, растворитель удаляли в вакууме и получали 48 мг (45%) ангидрида (IIв) в виде гигроскопического белого порошка.

Авторы выражают благодарность А. Т. Прудченко и И. А. Гандуринной, принимавшим участие в синтезе некоторых веществ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хомутов Р. М., Осипова Т. И. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1951.
2. Cassio D., Lemoine F., Waller J.-P., Sandrin E., Boissonas R. F. (1967) Biochemistry, 6, 827—835.
3. Cassio D., Robert-Gero M., Shire D. J., Waller J. P. (1973) FEBS Lett., 35, 112—116.
4. Jenks W. P. (1966) in: Current Aspect of Biochemical Energetics (Kaplan N. O., Kennedy E. P., eds.), pp. 273—298, Acad. Press, New York — London.
5. Khomutov R. M. (1967) Sympos. Struct. and Function of Peptides and Proteins, Abstr., p. 69, Riga.
6. Khomutov R. M. (1968) in: 5 Intern. Symp. on the Chem. of the Nature Products, Abstracts, pp. 210—211, London.
7. Хуре Е. Н., Северин Е. С., Диксон Г. Б., Хомутов Р. М. (1976) Молекулярн. биология, 10, 897—906.
8. Wolfenden R. (1976) Amer. Rev. Biophys. Bioenerg., 5, 271—306.
9. Myers T. C., Simon L. N. (1965) J. Org. Chem., 30, 443—446.
10. Kennedy E. P. (1956) J. Biol. Chem., 222, 185—191.
11. Tamari M., Cassaigne A., Lacoste A.-M., Neuzil E. (1975) Biochimie, 57, 97—103.
12. Краевский А. А., Киселев Л. Л., Готтих Б. П. (1973) Молекулярн. биология, 7, 769—775.
13. Осипова Т. И., Бирюков А. И., Гандурин И. А., Тарусова Н. Б., Хомутов Р. М. (1978) Биоорганич. химия, 5, 1471—1476.
14. Киселев Л. Л. (1971) в кн.: Молекулярные основы биосинтеза белков, с. 144, «Наука», М.
15. Loftfield R. B. (1972) Prog. in Nucl. Acid Research and Mol. Biol., 12, 87—128.
16. Crofts P. C., Kosolapoff G. M. (1953) J. Amer. Chem. Soc., 75, 3379—3380.
17. Huber J. W., Gilmore W. F., Robertson L. W. (1975) J. Med. Chem., 18, 106—108.
18. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жуков Ю. Н. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1391—1394.
19. Sramér F., Neunhoeffer H. (1962) Chem. Ber., 95, 1664.
20. Гутри Р. Д. (1967) в кн.: Методы химии углеводов, с. 58—66, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
3.VII.1978

\* Синтез этого соединения см. в одном из ближайших номеров журнала «Изв. АН СССР. Сер. хим.».

**ORGANOPHOSPHORUS ANALOGS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS.  
7. AMINOPHOSPHONYLADENYLATES — A NEW TYPE OF TRANSITION STATE  
ANALOGS IN THE SYNTHETASE REACTION AND EFFECTIVE AMINOACYL-tRNA  
SYNTHETASE INHIBITORS**

**KHOMUTOV R. M., OSIPOVA T. I., BIRYUKOV A. I., ISHMURATOV B. Kh.**

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

The anhydrides of AMP and aminophosphonic acids-organophosphorus analogs of aminoacyladenylates — were proposed for specific inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases. The synthetic methods for preparing such aminophosphonyladenylates were worked out. Specific and highly effective inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases was rationalized in terms of close resemblance between the inhibitors and the intermediate state of the enzymatic reaction.

---