



УДК 547.963.32.07:577.323.425

## ФОСФОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

### ХП\*. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТЕТРАФОСФАТА И ЕГО ФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ \*\*

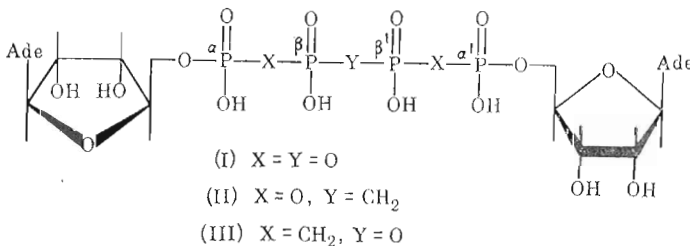
Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Брылов А. С.,  
Карнейский М. Я., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Разработаны пути синтеза фосфонатных аналогов P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-бис(5'-аденозил)тетрафосфата (A5'p<sub>4</sub>5'A), содержащих остаток метилendisфосфоновой кислоты: в одном из аналогов метиленовые группы расположены между P<sup>1</sup>- и P<sup>2</sup>-, а также P<sup>3</sup>- и P<sup>4</sup>-атомами, в другом — между P<sup>2</sup>- и P<sup>3</sup>-атомами. Предложен удобный препаративный метод синтеза A5'p<sub>4</sub>5'A из ADP в водном пиридине. Полученные соединения охарактеризованы УФ-, ЯМР- и КД-спектрами.

В настоящее время получен ряд данных, свидетельствующих об участии P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-бис(5'-аденозил)тетрафосфата, A5'p<sub>4</sub>5'A (I) в регуляции клеточного метаболизма. Наблюдалась зависимость скорости пролиферации клеток от концентрации внутриклеточного A5'p<sub>4</sub>5'A [2], показано снижение уровня этого нуклеотида при ингибировании белкового синтеза. A5'p<sub>4</sub>5'A влияет на активность ряда ферментов *in vitro*, в том числе ингибирует концевую нуклеотидилтрансферазу из тимуса [3], подавляет ADP-рибозилирование гистонов [4]. Установлено, что A5'p<sub>4</sub>5'A синтезируется *in vitro* некоторыми аминоксил-тРНК-синтетазами при взаимодействии связанного с ферментом аминоксиладенилата с АТФ [5, 6]. A5'p<sub>4</sub>5'A представляет собой метаболически нестабильное соединение, которое может расщепляться ферментами по фосфангидридным связям между P<sup>1</sup>- и P<sup>2</sup>-атомами или P<sup>2</sup>- и P<sup>3</sup>-атомами [6]. Однако неизвестно, какую роль играют эти ферментативные превращения в поддержании определенного уровня нуклеотидов в клетке и каков механизм действия A5'p<sub>4</sub>5'A как биологического регулятора.

В связи с возрастающим интересом к этим проблемам представляется целесообразным поиск новых путей синтеза этого соединения с целью сделать его более доступным для исследователей. Описанные в литературе методы синтеза динуклеозидполифосфатов в органических растворителях обладают рядом недостатков. При реакции образуется довольно сложная смесь продуктов, что затрудняет выделение, выходы не превышают 20% [7, 8].



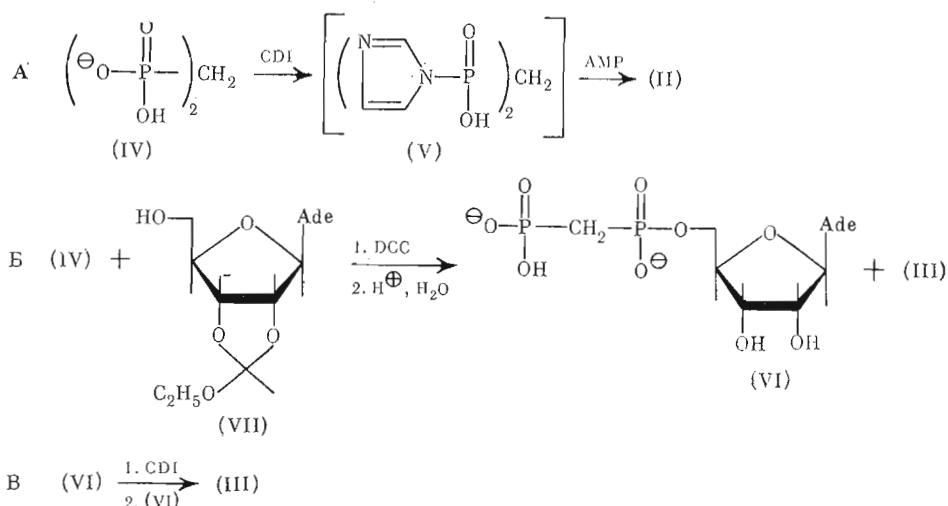
Нами разработан метод синтеза A5'p<sub>4</sub>5'A из ADP; реакция проводится в водном пиридине при 4° С с использованием N,N'-дициклогексилкарбоди-

\* Сообщение XI см. [1].

\*\* Сокращения: DCC — дициклогексилкарбодимид; CDI — N,N'-карбонилдимидазол.

имида как конденсирующего агента. Единственным продуктом реакции является А5'р,5'А, выход его составляет 60%. Полученное соединение соответствует по своим свойствам природному А5'р,5'А, описанному За-мечником [2, 5], оно не гидролизуется фосфоноэстеразой, но расщепляется фосфодиэстеразой змеиного яда, структура его подтверждена также <sup>1</sup>Н- и <sup>31</sup>Р-ЯМР-спектрами. По данным УФ-спектроскопии была определена процентная гипохромия для А5'р,5'А до и после гидролиза фосфодиэсте-разой змеиного яда, составляющая 24%.

Для изучения процессов, связанных с биосинтезом и ферментативными превращениями А5'р,5'А, перспективно применение его аналогов, устой-чивых к гидролизу ферментами. В этом отношении могут представлять ин-терес фосфонатные аналоги. Метиленовые аналоги АТР, например, в ряде случаев были использованы для изучения ферментов, утилизирую-щих АТР [9]. На примере двух фосфонатных аналогов А5'р,5'А, соедине-ний (II) и (III), в одном из которых метиленовая группа находится между



Р<sup>2</sup>- и Р<sup>3</sup>-атомами, а во втором — между Р<sup>1</sup>- и Р<sup>2</sup>-атомами, а также между Р<sup>3</sup>- и Р<sup>4</sup>-атомами соответственно, мы показали, какие пути синтеза доста-точно эффективны для получения симметричных соединений таких типов.

Синтез соединения (II) был проведен в соответствии со схемой А. Метилендифосфоновую кислоту (IV) обрабатывали N,N'-карбонилдими-дазолом, образующийся димидазолид (V) далее вводили в реакцию с из-бытком АМР, после чего реакционную смесь разделяли при помощи ионо-обменной хроматографии, выход фосфоната (II) при этом составлял 43%.

Наиболее удобным методом получения аналога (III) оказалась реакция конденсации аденозина, защищенного по гликольной группировке (прои-зводное (VII)), с метилдифосфоновой кислотой (IV) в присутствии ди-циклогексилкарбодимида при 4°С. Продуктами этой реакции, выделен-ными после снятия защитной группы, являлись 5'-фосфометилфосфо-ниладенозин (VI) (выход 51%) и соединение (III) (выход 20%) — см. схему Б. При синтезе аналога (III) по схеме В с использованием активаци-и имидазолом аналога (VI) выходы фосфоната (III) не превышали 2—5%. Производное (III) не удалось получить также из фосфоната (VI) в присутствии дициклогексилкарбодимида, в то время как такая димери-зация была осуществлена для АДР в водно-органической среде.

Гомогенность полученных соединений показана при помощи электрофо-реза, ТСХ на силикагеле и на пластинках с РЕИ-целлюлозой. При помощи ТСХ на силикагеле удается легко отличить вещества (II) и (III) от дру-гих продуктов реакций, имеющих несимметричную структуру. Аналоги (II), (III) отличаются от А5'р,5'А по подвижности на РЕИ-целлюлозе, их суммарный отрицательный заряд ниже, чем для А5'р,5'А. Это обусловлено их фосфонатной природой и распределением зарядов и электронной плот-

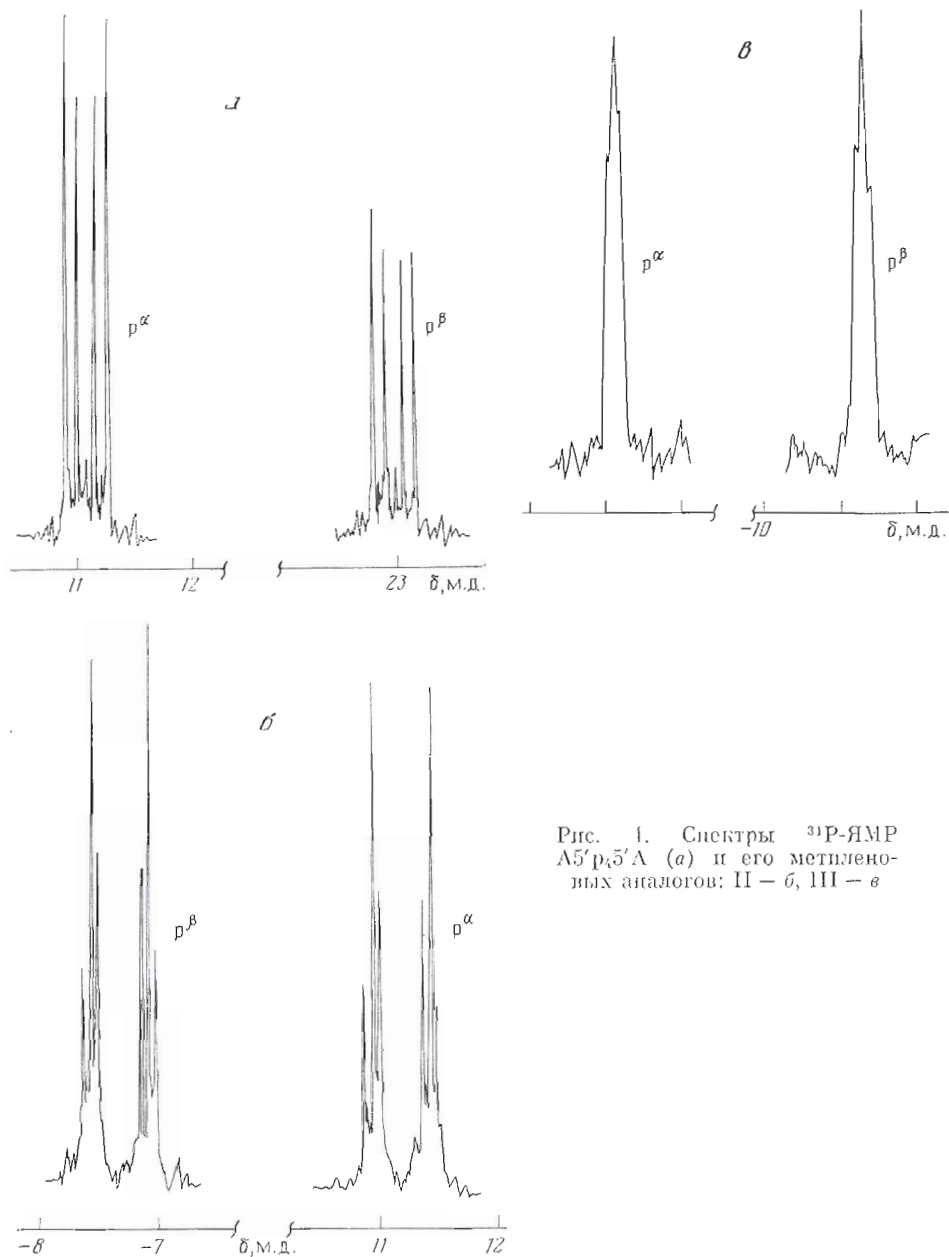


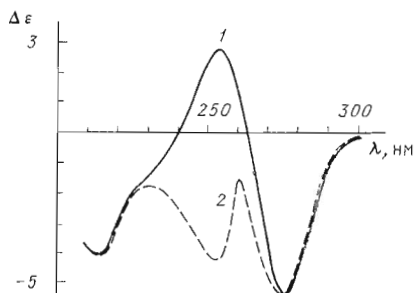
Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$  (а) и его метиленовых аналогов: II — б, III — в

ности в фосфорсодержащей цепочке, отличающимся от такового для  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$ .

Для  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$  и его аналогов характерны УФ-спектры с  $\lambda_{\text{max}}$  260 нм и  $\lambda_{\text{min}}$  230 нм. Все эти соединения имеют более низкий молярный коэффициент поглощения при pH 7, чем суммарное поглощение эквимольного количества мононуклеотида, что описано для  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$  в работе [5]. Для  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$  и его аналога (II) интенсивность поглощения возрастает после гидролиза (процентная гинохромия составляет соответственно 24 и 23%), тогда как для соединения (III), не гидролизующего ферментом, интенсивность поглощения не изменяется. Это свидетельствует о перекрывании плоскостей адениновых оснований в молекулах  $\text{A5}'\text{p}_i\text{5}'\text{A}$  и аналогов (II), (III).

Структуры соединений (I)–(III) были подтверждены  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрами. По данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров, синтезированные соединения представляют собой симметричные структуры. В спектрах имеется по

Рис. 2. Спектры КД для  $A5'p_45'A$  и его фосфонатных аналогов (рН 7,0  $I$  0,1; 22° С): 1 —  $A5'p_45'A$  и аналог (II), 2 — аналог (III)



одному сигналу для каждого из протонов адениновых оснований и протонов рибозы, у аналогов (II) и (III) дополнительно присутствуют сигналы протонов  $CH_2$ -групп, взаимодействующих с ядрами атомов фосфора.

В спектрах  $^{31}P$ -ЯМР для  $A5'p_45'A$  наблюдаются два симметричных квартета (рис. 1а), значения химических сдвигов приведены в таблице. Аналогичные значения химических сдвигов для атомов фосфора  $A5'p_45'A$  сообщаются в работе [6].

Химически симметричная тетрафосфатная цепочка в  $A5'p_45'A$  может быть рассмотрена как система четырех взаимодействующих ядер  $AA'XX'$ , где ядрам  $AA'$  соответствуют  $P^1, P^4$ , а ядрам  $XX'$  —  $P^2, P^3$ .

Исходя из экспериментального спектра  $A5'p_45'A$  были рассчитаны значения констант  $J_{\alpha\beta}$  и  $J_{\alpha\beta'}$ , т. е. константы спин-спинового взаимодействия  $J_{P^1P^2}$  и  $J_{P^1P^3}$  соответственно, как указано в работе [10], где рассмотрены возможные варианты взаимодействия ядер в таких системах, типы спектров и анализ констант спин-спинового взаимодействия. Значения констант спин-спинового взаимодействия ядер атомов фосфора в  $A5'p_45'A$  приведены в таблице.

Для  $^{31}P$ -ЯМР-спектров аналогов (II) и (III) характерен сдвиг сигналов фосфонатных атомов фосфора в сторону слабого поля. Подобные эффекты отмечены для фосфонатных аналогов АТР [11]. Сравнение спектров позволяет отнести сигналы к соответствующим ядрам фосфора в положениях  $\alpha$  или  $\beta$  фосфорсодержащего фрагмента в  $A5'p_45'A$  и его аналогах (см. рис. 1б).

Спектр аналога (II) содержит два дублета с константой спин-спинового взаимодействия около 25 Гц. Такой тип спектра обусловлен взаимодействием ядер  $P^1$  и  $P^2$  с константой  $J_{\alpha\beta}$ . Взаимодействие ядер атомов фосфора в этом аналоге несколько более сложное; об этом можно судить по тому, что каждый сигнал дублета имеет тонкую структуру триплета с низким значением константы взаимодействия (2–3 Гц). Выяснение природы такого расщепления требует дополнительных данных.

В спектре аналога (III) наблюдаются два триплета (рис. 1в). Можно предположить, что в данном случае имеют место взаимодействия ядер  $P^1$  и  $P^2$ , а также  $P^1$  и  $P^3$ , как и в случае  $A5'p_45'A$ , но значения констант  $J_{\alpha\beta}$  и  $J_{\alpha\beta'}$  очень близки.

Получены спектры кругового дихроизма соединений (I)–(III) при различных значениях рН ( $I$  0,1) в присутствии EDTA. Спектры  $A5'p_45'A$  и его аналога (II) при рН 7 имеют тот же характер, что и спектр  $A5'p_45'A$  в нейтральных условиях, описанный Замечником [12]; наблюдаются два

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц) сигналов атомов фосфора в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР  $A5'p_45'A$  и его аналогов

Соединение	$\delta_{P^\alpha}$	$\delta_{P^\beta}$	$J_{\alpha\beta}$ , Гц	$J_{\alpha\beta'}$ , Гц
(I)	11,19 к	22,88 к	13,2	5,2
(II)	11,00 д	-7,42 т	25,6	—
(III)	-17,65 т	-8,42 д	3,6	3,6
(IV)		-15 с	—	—

максимума: положительный — при 255 нм и отрицательный — при 278 нм. Спектр аналога (III) отличается от спектров А5'p,5'A и аналога (II) в коротковолновой области (рис. 2). Спектр КД для А5'p,5'A и аналога (II) соответствует, по-видимому, стэкинг-взаимодействию остатков аденина, которое зарегистрировано, как указывалось выше, при помощи УФ-спектров. Таким образом, замена кислородного атома между P<sup>β</sup>- и P<sup>β'</sup>-атомами метиленовой группой не оказывает заметного влияния на конформацию аналога (II) по сравнению с А5'p,5'A.

### Экспериментальная часть

Соединения (IV) и (VI) получены по методикам [13] и [14]. В работе использовали AMP, ADP и ATP (Reanal, ВНР); щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (Worthington, США); пластинки Silufol UV<sub>254</sub> (ЧССР) и пластинки с PEI-целлюлозой (Merck, ФРГ), бумагу FN-18 (ГДР), DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия).

Системы для ТСХ: на силуфоле — (СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>СНОН — NH<sub>4</sub>ОН — Н<sub>2</sub>О, 7 : 1 : 2 (А); на PEI-целлюлозе — 1 М LiCl (Б); система для электрофореза — 0,1 М СН<sub>3</sub>СООNa, рН 4,1 (В). Градиент напряжения при электрофорезе 69 В/см, время проведения 30 мин. УФ-спектры регистрировали на спектрометре Spereord (ГДР) и VSU2-P (ГДР), КД-спектры — на дихрографе Jobin Yvon Marck III (Франция) при *J* 0,1 с добавлением EDTA (2,5 · 10<sup>-4</sup> М). Концентрация А5'p,5'A и его аналогов 2 · 10<sup>-4</sup> М.

ЯМР-спектры получены на приборе Varian XL-100-15 (США) в режиме фурье-преобразований. <sup>31</sup>P-ЯМР-спектры снимали при шумовом подавлении сигналов протонов; обычно проводилось 200—400 накоплений. Образцы для спектров ЯМР очищали от ионов металлов при помощи смолы Chelex-100 (Bio-Rad, США) или дауэкса 50W×8. Все химические сдвиги в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах даны относительно *трет*-бутанола как внутреннего стандарта, а в <sup>31</sup>P-ЯМР-спектрах — относительно 85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> в качестве внешнего стандарта. В ЯМР-спектрах приняты следующие сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квартет.

А5'p,5'A. 476 мг (1 ммоль) динатриевой соли ADP растворяли в 4 мл смеси вода — пиридин (1 : 1), охлаждали до 0° С, добавляли 2,06 г (10 ммоль) ДСС, перемешивали 2 сут при 4° С. Осадок отделяли фильтрацией, фильтрат упаривали в вакууме, А5'p,5'A выделяли хроматографией на целлюлозе DE-32 в НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме (колонка 500 мл), используя линейный градиент концентрации NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> (2 л 0,2 М раствора NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> в смеси, 2 л 0,6 М раствора NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> в резервуаре). А5'p,5'A элюировали при концентрации буфера 0,48 М. Фракции, содержащие А5'p,5'A, упаривали в вакууме, обессоливали упариванием с водой и этанолом, лиофильно высушивали. Выход тетрааммониевой соли А5'p,5'A 300 мг (60%). *R<sub>f</sub>* 0,39 (А), 0,17 (Б) (для AMP *R<sub>f</sub>* 0,48 (Б), для ADP — 0,20 (Б), для ATP — 0,10 (Б)), *E<sub>ра</sub>* 1,7 (В), λ<sub>макс</sub> 259 нм (ε 25 300). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м.д.): 8,46 с, 8,16 с (8-Н, 2-Н), 6,05 д, *J* 5 Гц (1'-Н). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр приведен на рис. 2а, его характеристики — в таблице.

Гидролиз А5'p,5'A ферментами проводился в соответствии с методикой [5].

Аналог (II). К 176 мг (1 ммоль) кислоты (IV) в 10 мл смеси пиридин — вода добавляли 370 мг три-*n*-бутиламина, упаривали с абс. пиридином при 15 мм рт. ст. (40 мл×4), затем с абс. DMF (50 мл×3) при 5 мм рт. ст. К полученному раствору (объем ~50 мл) добавляли СДИ (1,64 г, 10 ммоль), перемешивали 12 ч, добавляли 0,5 мл MeOH, после чего через 30 мин прибавляли раствор бистрибутиламмониевой соли AMP (4,30 г, 6 ммоль), перемешивали 12 ч, упаривали в вакууме. Разделение реакционной смеси проводили хроматографией на колонке (500 мл) с целлюлозой DE-32 в НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме в градиенте концентраций NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> аналогично предыдущей методике. УФ-поглощающие фракции, соответствующие концентрации буфера 0,35—0,41 М, упаривали, обессоливали четырехкратным упариванием с водой и этанолом, рехроматографировали на целлюлозе DE-32

в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  от 0,3 до 0,5 М. Выход соединения (II) в  $\text{NH}_4^+$ -форме 217 мг (46%).  $R_f$  0,4 (А), 0,22 (Б),  $E_{\text{ра}}$  1,7 (В).  $\lambda_{\text{макс}}$  259 нм ( $\epsilon$  24 400).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\delta$ , м.д.): 8,46 с, 8,16 с (8-Н, 2-Н); 6,04 д,  $J$  5 Гц (1'-Н); 2,52 т,  $J$  20 Гц ( $\text{CH}_2$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр — см. таблицу и рис. 2.

*Аналог (III). а* К раствору 880 мг (5 ммоль) кислоты (IV) в 20 мл смеси пиридин — вода добавляли 1,85 г (10 ммоль) три-*n*-бутиламина, упаривали в вакууме, упаривали с абс. пиридином (50 мл $\times$ 3), доводя при последнем упаривании объем примерно до 3 мл, приливали 10 мл раствора 2',3'-О-этоксиметиленаденозина (VII) (660 мг, 2 ммоль) в абс. пиридине, добавляли 4,12 г (20 ммоль) DCC и перемешивали 4 сут при 4°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат разбавляли водой до 100 мл, экстрагировали эфиром (30 мл $\times$ 3), водный слой упаривали досуха. Остаток растворяли в 20 мл 50%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , нагревали 50 мин при 50°C, упаривали. Хроматографию на целлюлозе DE-32 проводили аналогично хроматографии  $\text{A5}'\text{p},5'\text{A}$  и аналога (II). Соединение (VI) элюировалось при концентрации буфера 0,25 М, производное (III) — при 0,42 М. Выход фосфоната (VI) 270 мг (51%), его свойства аналогичны описанным в работе [14],  $R_f$  0,45 (Б). Выход аналога (III) 210 мг (20%),  $R_f$  0,4 (А), 0,42 (Б),  $E_{\text{ра}}$  1,2 (В),  $\lambda_{\text{макс}}$  259 нм ( $\epsilon$  24 300).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\delta$ , м.д.): 8,60 с, 8,26 с (8-Н, 2-Н); 5,98 д,  $J$  4 Гц (1'-Н); 2,27 т,  $J$  20 Гц ( $\text{CH}_2$ ).

*б* 164 мг (0,4 ммоль) аммониевой соли соединения (VI) перемешивали с дауэксом 50W $\times$ 8 ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$ -форма), промывали смолу 30% водным пиридином, объединенные фильтраты упаривали в вакууме до 10 мл, добавляли 150 мг три-*n*-бутиламина, упаривали в вакууме с абс. пиридином (40 мл $\times$ 3), затем с DMF (60 мл $\times$ 3). К раствору добавляли 130 мг (0,8 ммоль) CDI, перемешивали 12 ч, добавляли 0,3 мл метанола и через 30 мин — раствор 2 ммоль бистрибутиламмониевой соли фосфоната (VI) в 30 мл DMF. Через 12 ч раствор упаривали в вакууме. Выделение аналога (III) из реакционной смеси и его характеристики см. в методике *а*. Выход аналога (III) составлял 2–5%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусова Н. Б., Яковлева Г. М., Прищепко А. А., Повикова З. С., Хомутов Р. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1982, № 2, с. 402–404.
2. Rapoport E., Zamecnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 11, p. 3984–3988.
3. Ono K., Iwata J., Nakamura H., Matsukage A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 34–40.
4. Tanaka J., Matsunami N., Yoshihara K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 99, № 3, p. 837–843.
5. Randerath K., Janeway C. M., Stephensen M. L., Zamecnik P. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 24, № 1, p. 98–105.
6. Plateau P., Mayaux J. F., Blanquet S. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4654–4662.
7. Adam A., Moffatt J. G. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 3, p. 838–842.
8. Reiss J. R., Moffatt J. G. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 18, p. 3381–3387.
9. Yount R. G. Adv. Enzymol., 1975, v. 43, p. 1657.
10. Попин Б. П., Ершов Б. А. ЯМР-спектроскопия в органической химии. Л.: Химия, 1967, с. 173–178.
11. Vogel H. J., Briger W. A. Biochemistry, 1982, v. 21, № 2, p. 394–401.
12. Scott J. F., Zamecnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 64, № 4, p. 1308–1314.
13. Cade J. A. J. Chem. Soc., 1958, № 11, p. 2226–2275.
14. Myers T. S., Nakamura K., Danieltrade H. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 8, p. 1517–1520.

Поступила в редакцию  
8.XII.1982

#### ORGANOPHOSPHOROUS ANALOGS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS. XII. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF DIADENOSINE TETRAPHOSPHATE AND ITS PHOSPHONATE ANALOGS

TARUSOVA N. B., SHUMIYANZEVA V. V., KRYLOV A. S.,  
KARPEISKY M. Ya., KHOMUTOV R. M.

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

Stable analogs of  $\text{A5}'\text{p},5'\text{A}$  may be helpful tools for the investigation of cell metabolism. Two phosphonate analogs of  $\text{A5}'\text{p},5'\text{A}$  were synthesized: one with methylene groups between  $\text{P}^1\text{P}^2$  and  $\text{P}^3\text{P}^4$ , and another with methylene group between  $\text{P}^2\text{P}^3$ . A convenient preparative method for the synthesis of  $\text{A5}'\text{p},5'\text{A}$  from ADP with DCC in water-pyridine media was worked up. The obtained compounds were characterized by UV, CD and NMR spectra.