



УДК 547.963.32.07

ФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ
3'(2')-О-АЦИЛАМИНОАЦИЛНУКЛЕОТИДОВ

Тарусова Н. В., Куханова М. Ю., Холматов Р. М.

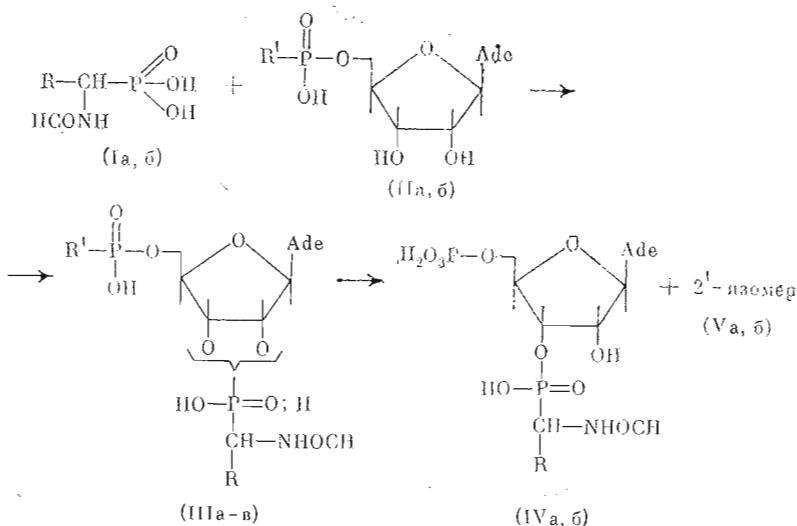
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы и разделены на 3'- и 2'-изомеры 3'(2')-О-(N-формилфенилаланил)- и 3'(2')-О-(N-формилметионил)фосфонаты рА. Показано, что они являются ингибиторами реакции рА (fMet-) с [³H] Phe-тРНК, катализируемой рибосомами *E. coli*.

Нами было описано применение некоторых фосфонатных аналогов 3'(2')-аминоацилнуклеотидов в синтетической реакции [1]. Они оказались эффективными специфическими ингибиторами соответствующих синтетаз, что можно связать со структурным подобием молекул аналогов молекулам природных субстратов и близким соответствием фосфонильного фрагмента переходному состоянию карбонильной группы сложноэфирной связи в аминоклнуклеотидах. Для получения специфических ингибиторов и исследования механизма функционирования пептидилтрансферазного центра рибосом (ПТЦ) представлялось интересным выяснить, будет ли описанный нами ранее подход эффективным для моделирования структур ациламиноацилнуклеотидов (АН). Ряд АН обладает донорными свойствами; их взаимодействие с ПТЦ рибосом было подробно изучено [2]. Требуемые модельные соединения могли представлять собой 2'- или 3'-ациламинофосфоновые эфиры адениловой кислоты типа (IV), (V) (схема). Известные данные по активности АН [3] определили выбор структур фосфонатных аналогов аминокислот и заместителей у аминогруппы. Синтез аналогов АН был осуществлен по схеме на с. 1176.

Конденсацию ациламинофосфоновых кислот (I) с монофосфоэфиром (IIa) или фосфамидом (IIб) проводили с помощью дициклогексилкарбодимидом. Для синтеза метиониновых аналогов (IVб, Vб) предпочтительно применяли фосфамид. Они были получены также из бензилфосфата (IIа), однако необходимость использования большого избытка катализатора при гидрировании и длительное время реакции делали этот путь неудобным. Удаление защитных групп из промежуточных нуклеотидилфосфонатов (III) известными методами [4] приводило к фосфонатам (IV), (V) с общим выходом 31—59%, которые оказалось возможным разделить на 2'- или 3'-изомеры, используя разницу в хроматографической подвижности на целлюлозе DE-32. Соотношение изомеров составляло примерно 1 : 1,2 с преобладанием 3'-изомера. Миграция фосфонильного остатка в условиях выделения была незначительна, и изомеры были получены в индивидуальном состоянии. Соотнесение изомеров сделано по химическому сдвигу

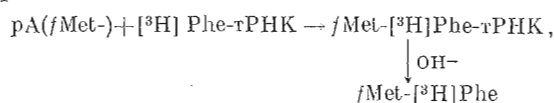
Принятое сокращение: рА(fMet-) и рА(fPhe-) — 2'(3')-О-(N-формилметионил)- и 2'(3')-О-(N-формилфенилаланил)аденозин-5'-фосфаты.



- a: R = PhCH₂—, R' = PhCH₂O—
 б: R = CH₃S(CH₂)₂—, R' = PhNH—
 в: R = CH₃S(CH₂)₂—, R' = PhCH₂O—

1'-Н рибозы в соответствии с известными аналогиями [2]. Данные ТСХ, электрофореза, периодатного окисления, фосфатазного гидролиза, УФ- и ПМР-спектров соответствовали структуре полученных соединений (таблица).

Полученные ациламинофосфонаты рА (IV), (V) в виде смеси изомеров ингибировали реакцию



катализируемую рибосомами *E. coli* в концентрациях, близких к концентрациям АН (миллимолярные). Известно, что рибосомы предъявляют жесткие требования к различным элементам структуры доноров и ингибиторов донорной активности, однако данные, позволяющие судить о возможностях модификации сложноэфирной связи, недостаточны. Проявление веществами (IV), (V) свойств ингибиторов показывает, что эти возможности достаточно широки и при использовании фосфонатов допустимо наличие отрицательного заряда в этом фрагменте молекулы ингибитора и замести-

Выходы и характеристики ациламинофосфонатов АМР

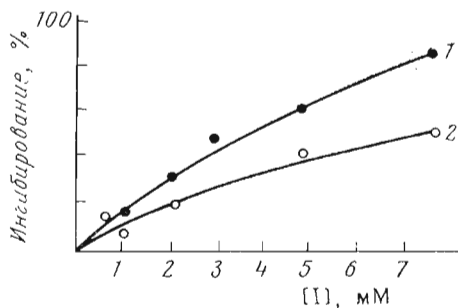
Вещество	Общий выход, %	Выход очищенных изомеров, %	ε ₂₆₀	R _f в системе		E _{pA}	Химические сдвиги, м.д.				
				1	2		2-Н	8-Н	1'-Н	C ₆ H ₅	CH ₂ S
(IIIa)	59	—		0,6	0,8	2,3					
(IIIб)	—	—				2,2					
(IIIв)	58	—		0,3		2,3					
(IVa)	46,5	18	14650	0,32 *	0,5	2,7	8,16	8,52	6,13	7,35	
(Va)		15	14200	0,25 *	0,5	2,7	8,24	8,59	6,28 **	7,38	
(IVб)	31,2	8,9	14100	0,21 *	0,4	2,7	8,12	8,41	60,7		2,01
(Vб)		7,2	13900	0,16 *	0,4	2,7	8,30	8,66	6,32		2,01

* Данные R_f приведены после 4-кратной хроматографии.

** J_{1'}, 2' 6 Гц.

теля в 5'-фосфатной группе. Испытание бензилового эфира (IIIв) показало, что это соединение подавляет рибосомальную реакцию, хотя и в меньшей степени, чем неэтерифицированные фосфаты (IVб) и (Vб).

Наибольшее внимание мы уделили аналогам (IVб) и (Vб) по причине их близкого соответствия структуре рА(fMet) (VI) — наиболее активного «минимального донора» [2, 3]. Поскольку в настоящее время нет четкого представления, с какого гидроксила рибозы донора происходит перенос пептида, исследование ингибирующей активности 3'- и 2'-изомеров (IVб) и (Vб) представляет большой интерес. Как уже отмечалось, эти вещества отличаются от АН устойчивостью к гидролизу и незначительной миграцией фосфонильного остатка. Оба соединения ингибировали рибосомальную реакцию, причем 50%-ное подавление реакции для 3'-изомера наблюдалось при концентрации 3,75, а для 2'-изомера — при 7,25 мМ (см. рисунок). В присутствии рС, оказывающего стимулирующее действие на рибосомальную реакцию [2, 3], ингибирование было меньше и составляло для 3'- и 2'-изомеров при концентрации 5 мМ соответственно 40—50 и 15—20%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фосфонаты (IVб) и (Vб) ингибируют рибосомальную реакцию, связываясь с донорным участком рибосом, причем структура, где ациламинофосфонильный остаток локализован на 3'-гидроксиле рибозы, предпочтительнее для этого связывания.



Зависимость ингибирования реакции рА(fMet-) с $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ от концентрации фосфонатов (IVв) (1) и (Vв) (2)

Экспериментальная часть

Для ТСХ использовали пластинки силуфол UV 254 (ЧССР) и кизельгель 60F₂₅₄ (Merck), для электрофореза — бумагу FN-18 (ГДР). Хроматографические системы: изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (1); бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 3 : 2 (2); насыщ. (NH₄)₂SO₄ — 1M CH₃COONH₄ — (CH₃)₂CHOH, 79 : 19 : 12 (3); насыщ. (NH₄)₂SO₄ — 0,05 M Na₂B₄O₇ — 0,1 M CH₃COONa — (CH₃)₂CHOH, 60 : 19 : 19 : 2 (4). Буфер для электрофореза: 0,05 M CH₃COONa, pH 4,1, градиент напряжения 69 В/см, значения E_{рА} приведены по отношению к подвижности рА. УФ-Спектры снимали на спектрофотометре Specord (ГДР), оптическую плотность определяли на приборе СФ-16. Спектры ПМР сняты в D₂O на спектрометре XL-100-15 (Varian, США), рабочая частота 100 МГц. Целлюлоза DE-32 — фирмы Whatman (Англия).

(R, S)- α -Формиламино- γ -метилтиопропилфосфоновая кислота (Iб). α -Амино- γ -метилтиопропилфосфоновая кислота (т. пл. 271—272°, R_f 0,11 в системе 1) была получена по известному методу [5]. К раствору 0,92 г (5 ммоль) этой кислоты в 5 мл HCOOH при охлаждении и перемешивании добавляли 3,5 мл (CH₃CO)₂O, через 24 ч приливали 5 мл HCOOH и 3,5 мл (CH₃CO)₂O, перемешивали 2 сут при 18°, раствор упаривали в вакууме досуха, затем упаривали с водой, растворяли в 16 мл 12% NH₄OH, упаривали досуха. Остаток растирали с этанолом, отфильтровывали и сушили над P₂O₅. Выход аммонийной соли (Iб) 0,94 г (76%). Т. пл. 190—193°, R_f 0,18 (система 1). В свободную кислоту соль переводили с помощью дауэкса 50W \times 8, лиофилизировали, переосаждали эфиром из этанола. Найдено, %: С 26,3; Н 5,95; Р 13,26. C₉H₁₂O₄NP · H₂O. Вычислено, %: С 26,00; Н 5,90; Р 13,35.

Аналогично из α -амино- β -фенилэтилфосфоновой кислоты [6] получена N-формиламинофосфоновая кислота (Ia), т. пл. 196—204°, R_f 0,17 в системе 1.

3'-(2')-O-[(R, S)- α -формиламино- β -фенилэтилфосфонил]аденозин-5'-фосфат (IVa), (Va). Раствор 275 мг (1,2 ммоль) формиламинофосфоновой кислоты (Ia) в водном пиридине упаривали в вакууме, сушили 4-кратным упариванием с пиридином, растворяли в 2 мл абс. пиридина. К раствору 436 мг (1 ммоль) бензилфосфата (IIa) в водном пиридине добавляли 1 ммоль триоктиламина, упаривали, высушивали упариванием с пиридином, растворяли в 5 мл абс. пиридина, соединяли с раствором кислоты (Ia), при 0° добавляли 4 ммоль дициклогексилкарбодиимида, перемешивали 96 ч при 18°. Осадок отделяли фильтрацией, фильтрат разбавляли 10 мл воды, экстрагировали эфиром, упаривали (здесь и далее упаривание водных растворов проводили при температуре не выше 40°), хроматографировали на целлюлозе DE-32 (HCO_3^- -форма, объем колонки 200 мл) в градиенте NH_4HCO_3 (1 л 0,25 М буфера, pH 7,5 в резервуаре, 1 л воды в смесителе). Элюаты концентрации 0,15—0,17 М упаривали, 2—3 раза упаривали с водой и этанолом для удаления NH_4HCO_3 . Для соединения (IIIa) R_f 0,7 (система 1), E_{pA} 2,03. Гидрирование бензильного эфира (IIIa) над Pd-чернью в 80% CH_3COOH проводили 2 ч, катализатор отделяли, промывали водой, фильтрат упаривали, хроматографировали на целлюлозе DE-32 (HCO_3^- -форма, объем колонки 200 мл, 1 л 0,3 М раствора NH_4HCO_3 в резервуаре, 1 л воды в смесителе). Элюаты концентрации 0,2—0,25 М буфера, содержавшие смесь веществ (IVa), (Va), упаривали до удаления NH_4HCO_3 , лиофилизировали. Получили 200 мг аммониевых солей. Выходы и характеристики веществ приведены в таблице.

Разделение смеси фосфонатов (IVa), (Va) на 3'- и 2'-изомеры. Раствор 290 мг смеси (IVa), (Va) наносили на колонку с целлюлозой DE-32 (3,5 × 30 см) и проводили градиентное элюирование (2 л 0,2 М NH_4HCO_3 в резервуаре, 2 л 0,1 М NH_4HCO_3 в смесителе), затем продолжали элюирование 0,2 М NH_4HCO_3 ; при этой концентрации буфера регистрировали два пика. Элюаты упаривали до удаления NH_4HCO_3 , полученные вещества дополнительно очищали на целлюлозе DE-32 в аналогичных условиях, после упаривания лиофилизировали. Получили 113 мг фосфоната (IVa) и 94 мг фосфоната (Va), которые, по данным спектров ПМР, являлись соответственно 3'- и 2'-изомерами. Характеристики веществ приведены в таблице.

Гидролиз смеси фосфонатов (IVa), (Va) щелочной фосфатазой. К раствору 1 мг смеси фосфонатов (IVa), (Va) в 1 мл 0,01 М буфера KHCO_3 — K_2CO_3 (pH 8,8) добавляли 2 ед. акт. щелочной фосфатазы (Sigma), выдерживали 3 ч при 37°. По данным ТСХ (система 1), в растворе не содержались исходные вещества, что свидетельствовало о полном отщеплении 5'-фосфата. В системах 3, 4 показано отсутствие примеси аденозина. В системе 4 продукт гидролиза обнаруживался в виде двух пиков равной интенсивности, соответствующих 2'- и 3'-изомерам (по аналогии с [6]). Значение E_{pA} для продуктов гидролиза указывало на наличие одного отрицательного заряда на молекулу.

3'-(2')-O-[(R, S)- α -Формил- γ -метилтиопропилфосфонил]аденозин-5'-фосфат (IVb), (Vb). К раствору 720 мг (1 ммоль) дициклогексилфенилгуанидиневой соли амида фосфата (IIb) [4] в 5 мл пиридина прибавляли 300 мг (1,3 ммоль) фосфоновой кислоты (Ib) и 820 мг (4 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 96 ч при 18°, после чего фильтровали, разбавляли фильтрат водой (5 мл), экстрагировали эфиром, водный слой упаривали. Остаток растворяли в 20 мл смеси изоамилнитрита, пиридина и CH_3COOH (2 : 1 : 1). Через 10 ч при 18° раствор упаривали, осветляли активированным углем, фильтрат наносили на колонку с целлюлозой DE-32 (300 мл, HCO_3^- -форма), колонку промывали 1 л водного 30% этанола, водой (0,5 л), разделение проводили NH_4HCO_3 (pH 7,5; 2 л

0,3 М буфера в резервуаре, 2 л воды в смесителе). При концентрации буфера 0,2—0,25 М регистрировали два пика. Элюаты, соответствующие каждому пику, упаривали, несколько раз упаривали с водой и этанолом. Получили 105 мг 3'-изомера (IVб) и 85 мг 2'-изомера (Vб). Вещества повторно хроматографировали на DE-32-целлюлозе, элюируя раствором NH_4HCO_3 в градиенте концентраций от 0 до 0,2 М и далее 0,2 М буфером. Получили 54 мг хроматографически чистого изомера (IVб) и 44 мг изомера (Vб) в виде аммонийных солей. Они не различались по значениям E_{pD} , но имели незначительные различия в R_f (система 1), которые удалось обнаружить при 4-кратной хроматографии. Выходы и характеристики соединений приведены в таблице.

3'(2')-O-[*(R, S)*- α -формиламино- γ -метилтиопропилфосфонил]аденозин-5'-бензилфосфат (IIIв). К высушенному отгонкой абс. пиридина раствору триоктиламмониевой соли аденозин-5'-бензилфосфата (из 270 мг, 0,62 ммоль диэфира (IIa) и 157 мг (0,74 ммоль) формиламинофосфоновой кислоты (Iб) в 8 мл абс. пиридина прибавляли 500 мг дициклогексилкарбодиимида. После перемешивания в течение 96 ч при 18° осадок отделяли, фильтрат разбавляли водой, экстрагировали эфиром, водный слой упаривали. Очистку на DE-32-целлюлозе проводили аналогично очистке соединения (IIIa). Элюат концентрации 0,16—0,18 М NH_4HCO_3 упаривали до удаления буфера, растворяли в 1 мл воды, осаждали 4 мл спирта. Выход бензилфосфата (IIIв) 245 мг (см. таблицу). Вещество не изменялось при окислении периодатом натрия и под действием щелочной фосфатазы. Раствор 30 мг бензилфосфата (IIIв) в 4 мл смеси воды и этанола (1 : 3) гидрировали над Pd-чернью. Катализатор (50 мг) добавляли 5 раз в течение 24 ч. Реакцию контролировали ТСХ (система 1). Катализатор отделяли, промывали водой, фильтрат упаривали. Разделение проводили на целлюлозе DE-32 аналогично описанному выше. Выделили 20 мг смеси фосфатов (IVб) и (Vб), выход 76%.

Изучение влияния фосфатов (IVб) и (Vб) на рибосомальную реакцию. Рибосомы *E. coli* MRE-600 выделяли известным методом [7]. Реакцию между производным (VI) и [^3H] Phe-tРНК проводили в системе, описанной ранее [8, 9]. Реакционная смесь содержала перед прибавлением метанола 0,06 М буфер трис-HCl (pH 7,5), 0,02 MgCl_2 , 0,4 KCl, 110 пмоль рибосом, 0,5 пмоль [^3H]Phe-tРНК, концентрация соединения (VI) в реакционной смеси составляла 10^{-3} М. Во второй группе опытов в реакционную смесь добавляли $2 \cdot 10^{-3}$ М рС. Ингибиторы (IVб) и (Vб) вносили в концентрациях, указанных на рисунке. Реакцию запускали прибавлением метанола (50% от общего объема). Инкубацию проводили в течение 1 ч, после чего реакцию останавливали добавлением 50 мкл 3 н. NaOH. Дальнейшую обработку проводили в соответствии с методикой [9]. Данные, полученные для опытов без рС, приведены на рисунке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Куханова М. К., Хомутов Р. М. (1978) Аминофосфонильные производные нуклеотидов — ингибиторы различных этапов биосинтеза белка. Тез. I Всес. совещания по химии нуклеозидов и нуклеотидов, Рига.
2. Kravetsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. (1975) *Nucleic Acids Res.*, 2, 2223—2236.
3. Краевский А. А., Куханова М. К., Готтих Б. П. (1977) в сб. Молекулярная биология, т. 9., серия «Итоги науки и техники», М.
4. Ohtsuka E., Ikehara M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 5507—5510.
5. Chalmers M. E., Kosolapoff G. M. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 5278—5283.
6. Zemlička J., Chládek S. (1969) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 34, 1007—1014.
7. Lessard J. H., Pestka S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6909—6917.
8. Cerna J., Rychlik J., Kravetsky A. A., Gottikh B. P. (1973) *FEBS Lett.*, 37, 188—191.

9. Котусов В. В., Куханова М. К., Викторова Л. С., Краевский А. А., Требоганов А. Д., Гнучев Н. В., Флорентьев В. Л., Готтих Б. П. (1976) Молекулярн. биология, 10, 1394—1901.

Поступила в редакцию
2.1.1978

PHOSPHONATE ANALOGS OF 3'(2')-O-ACYLAMINOACYLNUCLEOTIDES

TARUSOVA N. B., KUKHANOVA M. K., KHOMUTOV R. M.

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

The pA 3'(2')-O-(N-formylphenylalanyl)- and 3'(2')-O-(N-formylmethionyl)phosphonates were synthesized and resolved into 3'- and 2'-isomers. These compounds were shown to exert an inhibitory action on the pA(fMet-) reaction with [³H]Phe-tRNA catalyzed by *E. coli* ribosomes.
