



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ γ -АМИДОВ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИМЕТИЛЕНДИАМИНОВ

Доброправова О. В., Зыков С. А., Мустаев А. А.,
Невинский Г. А.

Новосибирский институт органической химии

Получен ряд производных полиметилендиаминов и гидразина структуры $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NHPPPAdo}$ ($n=2-8$), производных структуры $\text{Ado5'PPPNH}(\text{CH}_2)_n\text{NHPPP5'Ado}$ ($n=0; 2-8$), а также $\text{Ado5'PPPNH}(\text{CH}_2)_6\text{NHPPP5'Urd}$ и $\text{Ado5'PPP}\cdot\text{NHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{NHCOSCH}_2\text{NHPPP5'Ado}$. Все синтезированные соединения охарактеризованы с помощью полного и частичного гидролиза, УФ-спектроскопии, жидкостной микроколоночной хроматографии и ТСХ в нескольких системах. Обсуждается возможность использования таких соединений для исследования нуклеотидзависимых ферментов.

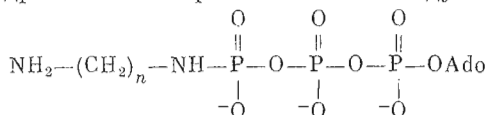
В настоящее время имеется несколько примеров исследования ферментов с помощью бифункциональных производных нуклеотидных субстратов (две молекулы субстрата связаны мостиком). Так, в работе [1] для определения расстояния между АТФ- и АМР-связывающими участками аденилаткиназы из мышц кролика использовали соединения типа $\text{Ado5}'P_n\text{5}'\text{Ado}$ ($n=2-5$). Эти бифункциональные производные аденозина, а также бифункциональные производные NAD были применены для осаждения ферментов [2-3]. Соединения типа $\text{Ado5}'PP5'\text{Gua}$ использовали при исследовании рибосом [4].

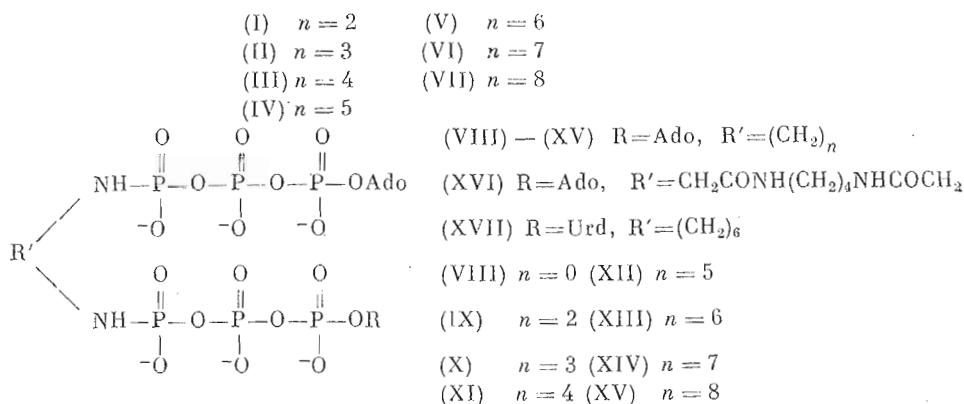
Эффективность связывания бифункциональных аналогов субстратов с ферментами при различных расстояниях между двумя остатками субстрата в молекуле может зависеть от ряда факторов. По изменению эффективности взаимодействия таких бифункциональных аналогов с ферментами можно судить о расстоянии между активными центрами, наличии отрицательной или положительной кооперативности между активными центрами фермента, когда в используемом ряду аналогов есть такие, которые образуют комплексы одновременно с двумя активными центрами димерного фермента.

Нам представлялось интересным синтезировать ряд бифункциональных производных АТФ с достаточно большим диапазоном расстояний между остатками нуклеозид-5'-трифосфата.

В настоящее время в литературе описано несколько методов синтеза γ -амидов нуклеозидтрифосфатов. Три из них, с нашей точки зрения, наиболее удобны [5-7]. В первом методе для активации нуклеозидтрифосфатов в водной среде использован водорастворимый карбодимид [5]. Второй метод — активация нуклеозид-5'-трифосфатов в неводных растворителях с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида [6]. Третий метод — окислительное фосфорилирование аминов в присутствии 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина [7]. Ранее [5-11] с помощью этих методов были синтезированы различные амиды и ацилиды (в том числе фотоактивные) нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов.

В данной работе была оценена возможность использования указанных методов для синтеза моно- и бифункциональных производных полиметилендиаминов и гидразина. Мы провели синтез следующих аналогов АТФ:





В зависимости от используемого амина в принципе есть два пути синтеза γ -амидов нуклеозид-5'-трифосфатов: активация нуклеозидтрифосфата в присутствии амина [8–11] или добавление амина к промежуточному нуклеозидтриметафосфату [5–7, 11]. В связи с очень высоким pK (~ 10) аминогрупп полиметилендиаминов в нашем случае при использовании любого из указанных выше методов был возможен только второй вариант синтеза. Известно, что синтез амидов с помощью водорастворимого карбодимида в этом варианте не может дать высокого выхода продукта [12]. Нами было показано, что моно- (I)–(VII) и бифункциональные производные АТР (VIII)–(XV) могут быть получены с помощью водорастворимого карбодимида, но выходы не превышают 30–40 и 10–15% соответственно. Синтез моно- и бис-АТР-производных гидразипа протекал (как в случае использования водорастворимого карбодимида, так и динциклогексилкарбодимид или окислительного фосфорилирования) без заметных особенностей по сравнению с синтезом соответствующих производных полиметилендиаминов. В связи с этим ниже мы не будем отдельно обсуждать этот случай.

Активацию нуклеозидтрифосфатов с помощью динциклогексилкарбодимида проводили согласно работе [6] с некоторыми модификациями. К образованному из АТР триметафосфату добавляли полиметилендиамин. При добавлении непосредственно диамина в раствор триметафосфата аденозина (растворитель диметилформамид или диметилсульфоксид) выпадали плотные осадки, а выход продуктов был минимальным. Выпадения осадков удается избежать, добавляя к раствору активированного АТР водный раствор диамина. В случае синтеза бис-АТР-производных полиметилендиаминов (VIII)–(XV) одновременно с диамином в реакционную смесь добавляли триэтиламин, что было необходимо для более эффективного образования продуктов. При синтезе моно- и бифункциональных продуктов производных АТР полиметилендиамины и АТР использовали в соотношении 10–15 : 1 и 1 : 2–3 соответственно. В целом этот метод оказался эффективным для синтеза как моно-, так и бис-АТР-производных диаминов. Соединения (I)–(VII) и (VIII)–(XV) были получены с выходами 80–90 и 40–55% соответственно.

Альтернативным вариантом, как указывалось выше, является активация АТР в присутствии 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина, которую проводили в диметилсульфоксиде (или диметилформамиде) согласно [7]. Как и в случае использования N,N'-динциклогексилкарбодимида, при добавлении диаминов в раствор активированного АТР выпадали плотные осадки. Выпадение осадков наблюдалось и при добавлении водных растворов диаминов (в 10–14-кратном избытке по отношению к АТР). Эффективное образование монофункциональных производных АТР (I)–(VII) достигалось при добавлении к раствору триметафосфата аденозина растворов диаминов в 50% водном метаноле. Соединения (I)–(VII) были получены с выходом 95–99%. В случае синтеза бифункциональных производных АТР (VIII)–(XV) количество добавляемых полиметилендиаминов было приблизительно в 20 раз меньше. Добавление водно-спиртовых

растворов диаминов в этом случае не приводило к эффективному образованию продуктов (выходы не более 15%). Соединения (VIII)–(XV) были синтезированы с выходами 20–25% при добавлении к триметафосфату аденозина водных растворов диаминов, содержащих триэтиламин. В целом этот метод оказался наиболее эффективным для синтеза монофункциональных производных АТР (I)–(VII).

Одним из путей увеличения эффективности фосфорилирования полиметилендиамина триметафосфатом могла быть депротонизация аминогрупп с помощью сильных оснований типа триэтиламина. Однако при добавлении в реакционную смесь триэтиламина одновременно с диамином наблюдалось уменьшение выхода монофункциональных аналогов АТР и образование АDP. Количество образующегося в присутствии триэтиламина АDP зависело от числа метиленовых звеньев в фосфорилируемом диамине. Так, при использовании АТР, этилендиамина и триэтиламина в соотношении 1:15:7 содержание АDP в конечной смеси составляло 40–45% и уменьшалось до 3–4% и менее 1% при синтезе γ -амидов АТР-производных тетраметилендиамина (III) и гексаметилендиамина (V) соответственно. Скорее всего накопление АDP в присутствии триэтиламина связано с внутримолекулярным расщеплением фосфодиаэфирной связи между γ - и β -атомами фосфора в молекулах γ -амидов (I)–(VII) под действием свободной аминогруппы аналогов. Такого рода реакции внутримолекулярного расщепления фосфодиаэфирных связей наблюдали ранее [13] в случае соединений типа γ -2-оксиэтиламида АТР при обработке последних основаниями в мягких условиях. Эффективность такого рода реакций, как отмечается в работе [14], должна уменьшаться с увеличением расстояния между реагирующими группами, что согласуется с нашими результатами. Отсутствие подобной реакции расщепления при проведении синтеза без добавления триэтиламина, очевидно, обусловлено тем, что нефосфорилированная аминогруппа протонирована.

В связи с этим следует подчеркнуть, что эффективное образование бифункциональных аналогов АТР (VIII)–(XVI) наблюдалось только в присутствии триэтиламина. По-видимому, протонированная аминогруппа образует достаточно устойчивую внутреннюю соль с фосфатными остатками монофункционального аналога АТР после его образования. Устойчивость внутренней соли может быть обусловлена высокой эффективной концентрацией аминогруппы в монофункциональных производных АТР, которая может превышать реальную локальную концентрацию ионов аммония в аммониевых солях нуклеозидтрифосфатов, как в случае других соединений, на 5–7 порядков [15]. Присутствие триэтиламина для эффективного образования бифункциональных аналогов АТР (VIII)–(XV), по-видимому, необходимо для разрушения внутренней соли и депротонизации аминогруппы. В то же время одной из причин синтеза бифункциональных аналогов АТР с выходами не более 60%, по-видимому, является конкурирующее с реакцией фосфорилирования второй аминогруппы в присутствии триэтиламина внутримолекулярное расщепление фосфодиаэфирной связи в первоначально образующихся монофункциональных аналогах АТР (I)–(VII).

АDP, образующийся в реакционной смеси после добавления водных растворов диаминов, не дает продуктов конденсации с полиметилендиаминами. В то же время предварительно активированный с помощью N,N'-дигидроксикарбонимидом или 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина АDP реагирует с полиметилендиаминами. Реакционные смеси после добавления в них диаминов имеют рН выше 7,0–7,5. Известно, что в водных растворах активация нуклеотидов с помощью 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина не протекает [7], а с помощью карбонимидов эффективно протекает только при рН растворов ниже 6,0–6,5 [5]. Скорее всего с этим связано отсутствие реакции между диаминами и АDP, образующимися после добавления полиметилендиамина.

Синтезированные нами монофункциональные производные АТР (I)–(VII) представляются перспективными для синтеза различного рода бифункциональных аналогов субстратов ферментов. Так, свободную амино-

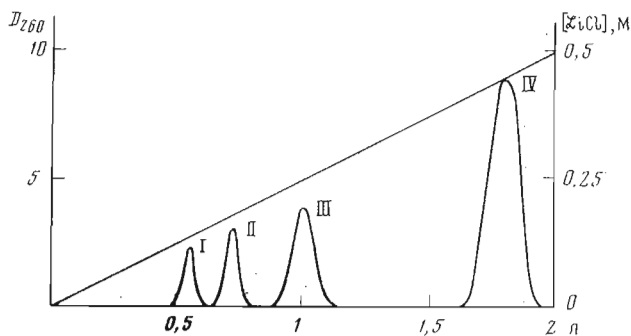


Рис. 1. Хроматографическое выделение ди-АТР-производного гексаметилендиамина (XIII) на DEAE-целлюлозе (Cl⁻-форма) в градиенте концентрации LiCl (рН 8,0). Пик I соответствует γ -(6-аминогексил)амиду АТР (V): II — ADP, III — АТР; IV — производному (XIII)

группу этих соединений можно использовать для присоединения других моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов, аминокислот и т. д.

Последовательным фосфорилированием полиметилендиаминов были получены бифункциональные производные АТР (VIII) — (XV). К триметафосфату аденозина добавляли 3–5-кратный избыток монофункциональных производных АТР (I) — (VII). При активации АТР с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида или 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфиша соединения (VIII) — (XV) образуются с выходами 40–50 и 40–60% соответственно.

На основе производного гексаметилендиамина (V) нами было синтезировано соединение (XVII), в котором одна из аминогрупп диамина фосфорилирована γ -фосфатным остатком АТР, а другая — γ -фосфатным остатком УТР. Для синтеза этого соединения к триметафосфату уридина, полученному с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида, добавляли эквивалентное количество γ -(6-аминогексил)амида АТР (V). Выход соединения (XVII) составлял 30–35%.

Одним из возможных путей значительного удлинения «мостиков» между нуклеотидами в бифункциональных производных АТР может быть использование бифункциональных производных аминокислот, в которых карбоксильные группы двух молекул аминокислот соединены «мостиками» из полиметилендиаминов. В то же время такие производные аминокислот представляют самостоятельный интерес для исследования некоторых олигомерных ферментов, взаимодействующих с аминокислотами. Мы провели синтез бифункционального производного глицина — N,N'-диглицилтетраметилендиамина (XVIII).

Было показано, что конденсация избытка N-трифторацетилглицина с тетраметилендиамином в абс.диметилформамиде в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида с последующим удалением защитных групп приводит к образованию диамина (XVIII) с высоким выходом (70–80%). Аналогичный результат был получен при конденсации N-трифторацетилфенилаланина с гексаметилендиамином (эксперимент не приводится).

Полученный нами диамин (XVIII) был использован для синтеза бифункционального производного АТР (XVI). Конденсацию этого диамина с АТР проводили с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида. Выход бифункционального аналога (XVI) составил 30%.

Все синтезированные соединения (I) — (XVII) были выделены из реакционных смесей с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе в линейных градиентах концентраций ТЕАВ (монофункциональные (I) — (VII) производные) или хлористого лития (бифункциональные (VIII) — (XVII) производные). Элюция всех монофункциональных производных (I) — (VII) наблюдалась при концентрации ТЕАВ 0,07–0,08 М. В качестве примера очистки бифункциональных производных АТР на рис. 1 приведены данные хроматографического выделения соединения (XII). Замена ТЕАВ на хлористый литий в случае бифункциональных производных (VIII) —

Хроматографические подвижности аналогов АТР

Соединение	R_f в системе			Соединение	R_f в системе		
	А	Б	В		А	Б	В
(I)	0,24	0,20	0,21	(VIII)	0,10	0,23	0,30
(II)	0,28	0,21	0,19	(IX)	0,13	0,26	0,33
(III)	0,25	0,15	0,13	(X)	0,15	0,27	0,36
(IV)	0,33	0,20	0,17	(XI)	0,16	0,26	0,32
(V)	0,39	0,17	0,16	(XII)	0,18	0,27	0,30
(VI)	0,45	0,26	0,20	(XIII)	0,30	0,30	0,31
(VII)	0,47	0,28	0,23	(XIV)	0,35	0,34	0,33
				(XV)	0,46	0,21	0,22
				(XVI)	0,1	0,34	—

(XVII) позволила избежать частичного гидролиза этих соединений при хроматографии и последующем выделении сухих продуктов.

После очистки гомогенность продуктов определяли методами ТСХ (см. таблицу) и микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона-Тенера [16]. Аналоги АТР были гомогенны по данным метода ТСХ, а также по данным микроколоночной хроматографии. Монофункциональные аналоги (I)–(VII) элюировались со смолы как соединения, имеющие два отрицательных заряда, а бифункциональные аналоги (VIII)–(XVII) – как шестизарядные соединения.

Все синтезированные аналоги АТР были охарактеризованы с помощью УФ-спектроскопии. Однотипные аналоги имеют практически идентичные спектры. Так, все монофункциональные аналоги (I)–(VII) при pH 5,0 имеют $\lambda_{\text{макс}}$ 258 нм, а $\lambda_{\text{мин}}$ 231 нм; при pH 13 для всех производных $\lambda_{\text{макс}}$ равно 260 нм, а $\lambda_{\text{мин}}$ 229,5 нм. Все синтезированные бифункциональные аналоги АТР (VIII)–(XVI) при pH 5,0 имеют $\lambda_{\text{макс}}$ 260 нм, а $\lambda_{\text{мин}}$ 229 нм; при pH 13,0 для них характерны $\lambda_{\text{макс}}$ 261 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 230 нм. Спектральные характеристики аналогов АТР несущественно отличаются от спектральных характеристик для АТР.

При гидролизе гомогенных по всем тестам препаратов монофункциональных производных (I)–(VII) в 0,1 н. HCl при 25° С в течение 1–2 ч получают АТР и соответствующие диамины в соотношении 1 : 1. Продукты гидролиза идентифицированы с помощью метода ТСХ и микроколоночной хроматографии.

Бифункциональные аналоги АТР (VIII)–(XV) оказались менее стабильными при кислотной обработке. Результат анализа смеси продуктов гидролиза бис-АТР-производного пентаметиленадиамина (XII) до инкубации и после инкубации в 0,01 н. HCl при 25° С в течение 10 мин и 1 ч показывает (рис. 2), что через 10 мин после инкубации аналога в кислом растворе присутствуют исходное бифункциональное производное (XII), монофункциональное производное (IV) и АТР. Спустя 1 ч в смеси практически отсутствует исходный бифункциональный анализ АТР (XII). Аналогичный результат получен при исследовании других бифункциональных аналогов АТР (VIII)–(XV). Время полугидролиза бифункциональных аналогов АТР в указанных условиях равно приблизительно 10 мин.

Согласно данным анализа с помощью микроколоночной хроматографии производного гексаметилендиамина (XVII), содержащего в своем составе АТР и УТР, до и после полного кислого гидролиза этого соединения в продуктах полного гидролиза присутствуют АТР и УТР в эквимольных соотношениях, что служит подтверждением структуры этого соединения (рис. 3).

Таким образом, синтезирован ряд новых аналогов АТР. Моно- и бифункциональные аналоги АТР исследованы в реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* штамма MRE-600. Все аналоги являются ингибиторами фермента. Обнаружена субстратная активность некоторых бифункциональных аналогов АТР в системе ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli*.

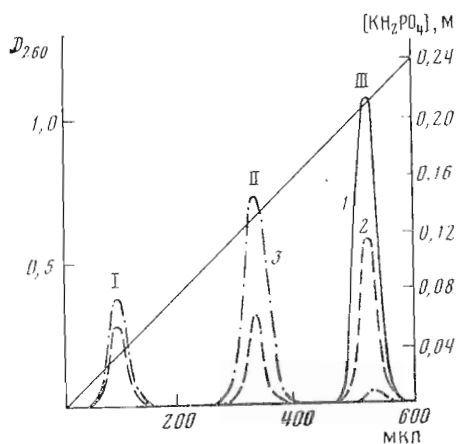


Рис. 2

Рис. 2. Разделение с помощью микроколоночной хроматографии продуктов кислото-гидролиза ди-АТР-производного пентаметилендиамина (XII) на целлюлозе DE-41 в системе Томлинсона-Тенера: 1 – бифункциональное производное АТР (XII) до гидролиза, 2 – через 10 мин и 3 – 1 ч инкубации соединения (XII) в 0,01 н. HCl при 25° С. Пик I соответствует моноамиду АТР (IV); II – АТР; III – бифункциональному аналогу АТР (XII)

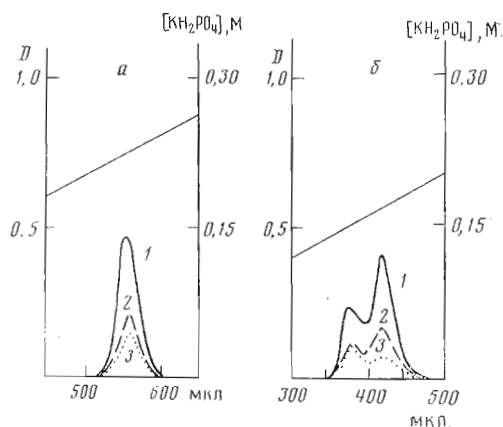


Рис. 3

Рис. 3. Анализ с помощью микроколоночной хроматографии производного гексаметилендиамина, содержащего остатки АТР и УТР (XVI), и продуктов его полного гидролиза на целлюлозе DE-41 в системе Томлинсона-Тенера (0–0,3 М K_2HPO_4 , 750 мкл): а – исходное соединение (XVI); б – продукты полного гидролиза соединения (XVI). 1 – изменение оптической плотности при 260 нм, 2 – при 240 нм, 3 – при 280 нм

Экспериментальная часть

В работе использовали глицин, АТР, УТР (Reanal, ЧССР), 2,2'-дипиридилдисульфид и гидразин (Merck, ФРГ), трифенилфосфин (Chemapol, ЧССР), N,N'-дициклогексилкарбодимид (Serva, ФРГ). Водорастворимый *p*-толуолсульфонат N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодимид получен из НИОХ СО АН СССР. Этилендиамин – производства «Союзреактив», другие полиметилендиамины – фирмы Lawson (Англия), остальные реактивы квалификации х.ч. и ос.ч.

В работе использовали также миллипоровые фильтры HUFFS (Chemapol, ЧССР), DEAE-целлюлозу отечественного производства и целлюлозу DE-41 (Whatman, Англия) для микроколоночной хроматографии. В работе использовали нуклеозидтрифосфаты, содержащие не более 1% примесей.

Гомогенность продуктов контролировали с помощью ТСХ на стандартных пластинках Silufol UV 254 (Kavalier, ЧССР) в системах: изомаэляная кислота – триэтиламин – вода, 66 : 1 : 33 (А), диоксан – вода – конц. аммиак, 6 : 4 : 1 (Б), изопропанол – триэтиламин – вода, 7 : 1 : 2 (В), а также с помощью метода микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона-Тенера (7 М мочевины, калий-фосфатный буфер, pH 7,5) на целлюлозе DE-41.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре Specord UV-VIS (ГДР).

Синтез аналогов АТР с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимидов. Активацию АТР проводили согласно работе [6] с некоторыми модификациями. Раствор 0,5 ммоль АТР (Et_3NH^+ -форма) в 10 мл абс. диметилформамида предварительно выдержанного в течение 1–2 сут с 7,5 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодимидом, инкубировали 5 ч при 20° С и добавляли 0,2–7,5 ммоль одного из полиметилендиаминов в 5 мл воды. В случае синтеза монофункциональных производных (I)–(VII) максимальный выход (80–90%) достигался при использовании АТР и диамина в соотношении 1 : 10–15. При синтезе бифункциональных производных (VIII)–(XV) максимальный выход 40–55% был получен при использовании АТР и

диамина в соотношении 3 : 1 и добавлении метафосфата в водный раствор, содержащий диамин и 0,2–0,5 мл триэтиламина. Через 30 мин в реакционную смесь добавляли 0,5 мл насыщенного водного раствора LiClO_4 и 100 мл ацетона. Выпавший осадок отделяли от маточника центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин, растворяли в 50 мл воды и использовали для выделения гомогенного продукта как описано ниже.

Синтез аналогов АТР с помощью 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина. Активацию АТР с помощью 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина проводили согласно [7] с некоторыми модификациями. Раствор 0,5 ммоль АТР (Et_3NH^+ -форма) в 10 мл абс. диметилсульфоксида (или диметилформамида), содержащего 0,75 ммоль 2,2'-дипиридилдисульфида и 0,75 ммоль трифенилфосфина, встряхивали 1 ч при 20° С до полного растворения АТР. Затем к реакционной смеси добавляли соответствующий диамин: 10–15-кратный избыток (5–7,5 ммоль) по отношению к АТР при синтезе монофункциональных производных (I)–(VII) и 2–3-кратный недостаток (0,17–0,25 ммоль) диамина при синтезе бифункциональных производных (VIII)–(XV). При синтезе бифункциональных аналогов к 20 мл 50% водного метапола добавляли 0,2–0,5 мл триэтиламина и диамин и затем приливали к раствору триметафосфата аденозина при энергичном перемешивании. Через 30 мин реакционную смесь выливали по каплям в 200 мл ацетона, содержащего 2% NaClO_4 , выдерживали 2–3 ч при –10° С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и подвергали хроматографии как описано ниже.

Синтез бифункционального производного (XVII). К 12 мг γ -(6-аминогексил)амида АТР в 100 мкл воды добавляли 10 мкл триэтиламина и 300 мкл 0,14 М раствора триметафосфата уридина в DMSO, полученного по аналогии с синтезом триметафосфата аденозина. Смесь выдерживали 30 мин при 20° С и затем обрабатывали как описано выше. Выход продукта 25–30%. Соотношение D_{240}/D_{260} и D_{260}/D_{280} равно 0,36 и 0,34 соответственно.

Очистка монофункциональных аналогов АТР. Осадки, полученные при синтезе γ -амидов АТР (I)–(VII), растворяли в 50 мл воды, фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр для удаления нерастворимого в воде осадка и наносили на колонку (2,6×30 см) с DEAE-целлюлозой (HCO_3^-). Гомогенные продукты элюировали в линейном градиенте концентраций TEAB, pH 7,5 (0–0,18 М), объемом 2 л со скоростью 100–150 мл/ч. Объем фракций 10–15 мл. Элюцию продуктов контролировали по поглощению при 260 нм. Фракции, соответствующие пику продукта, объединяли и упаривали при 25–30° С. Продукты переводили в натриевую форму переосаждением из 100 мл ацетона, содержащего 2% NaClO_4 . Осадок трижды промывали ацетоном и затем сушили в вакууме. С помощью $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодимидом было получено по 150–300 мг, а окислительное фосфорилирование дало 160–350 мг монофункциональных аналогов АТР.

Очистка бифункциональных аналогов АТР. Осадки, полученные при синтезе γ -амидов АТР (VIII)–(XVII) разными методами, растворяли в 50 мл воды, фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр и наносили на колонку (2,5×40 см) с DEAE-целлюлозой (Cl^-). Соединения элюировали в линейном градиенте LiCl (0–0,5 М) объемом 2 л при pH 8,0. Фракции, соответствующие бифункциональным аналогам (VIII)–(XVII), объединяли и упаривали при 25° С до минимального объема (2–3 мл). К остатку добавляли 0,5 л ацетона и 50 мл этанола. Смесь перемешивали до исчезновения границы раздела фаз, затем оставляли на 5–7 ч при –20° С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием. Все продукты получены в литиевой форме по аналогии с получением натриевых солей монофункциональных аналогов АТР, как описано выше. С помощью $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодимидом было получено 70–140 мг, а окислительным фосфорилированием – 20–70 мг сухих препаратов бифункциональных аналогов АТР.

Анализ структуры аналогов АТР. Гомогенные, по данным ТСХ и микроколоночной хроматографии, монофункциональные производные (I)–(VII) подвергали гидролизу 0,1 н. HCl при 25° С в течение 1–2 ч. Бифункциональные аналоги АТР (VIII)–(XVI) гидролизovali 2,5–3 ч 0,01 н. HCl при 25° С. Продукты гидролиза идентифицировали с помощью методов

ТСХ и микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона-Тенера. Положение пятен (соответствующих полиметиленаминам) на пластинках идентифицировали с помощью цветной реакции диаминов с нингидрином (пластинки опрыскивали 0,2% раствором нингидрина в ацетоне). Согласно полученным данным, продукты полного гидролиза моно- и бифункциональных аналогов (I)–(XVI) содержали АТР и соответствующие диамины. При использовании указанных условий гидролиза суммарное количество АДР и АМР (определяли микроколоночной хроматографией) в продуктах гидролиза моно- и бис-АТР-производных не превышало 4–5 и 0,5–1,0% соответственно. Количество образующегося при гидролизе АТР определяли спектрофотометрически после очистки с помощью хроматографии. Количество фосфатных остатков в нуклеотиде определяли по элюирующей концентрации буфера при хроматографии. Дополнительный анализ количества фосфатных групп в аналогах АТР проводили после полного окисления аналогов в смеси серной и азотной кислот согласно [17] с помощью колориметрического метода по образованию молибденовой сини согласно [18]. Калибровочная кривая была получена с помощью растворов, содержащих известное количество $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Количество диаминов в гидролизате определяли по поглощению продуктов взаимодействия диаминов с 2,4-динитрофторобензолом и калибровочных кривых для соответствующих диаминов согласно [19]. Ошибка использованных методов не превышала 5%. Было установлено, что монофункциональные и бифункциональные аналоги АТР содержат диамины и АТР в соотношении 1:1 и 1:2 соответственно.

Синтез N,N'-диглицилтетраметиленамина (XVIII). N-Трифторацетилглицин синтезировали по аналогии с синтезом N-трифторацетилфенилаланина [20]. К 5 г глицина в 120 мл этилацетата добавляли 30 мл трифторуксусного ангидрида при 20°С, смесь встряхивали в течение ~15 ч до полного растворения аминокислоты. Затем раствор упаривали в вакууме досуха, к сухому остатку добавляли 100 мл 50% водного этанола и снова раствор упаривали досуха для удаления следов трифторуксусной кислоты. Получено 9,2 г продукта, который перекристаллизовывали из эфира. Выход соединения 7,8 г (80%). Найдено %: С 24,90; Н 2,85; N 9,65. $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$. Вычислено, %: С 25,01; Н 2,80; N 9,73.

N,N'-Диглицилтетраметиленамин (XVIII) получали конденсацией 1 г N-трифторацетилглицина с 0,2 г тетраметиленамина в 25 мл диметилсульфоксида в присутствии 1,5 г N,N'-дициклогексилкарбодимида в течение 20 ч при 20°С. Для снятия трифторацетильных групп с α -аминогрупп остатков глицина в продукте конденсации к полученному раствору добавляли 60 мл 25% раствора аммиака и смесь встряхивали 1 сут при 20°С. После удаления аммиака упариванием раствора в вакууме до 25 мл к раствору добавляли 50 мл ацетона. Выпавший осадок фильтровали, к маточному раствору добавляли еще 25 мл ацетона. Выпавший осадок снова отделяли от маточного раствора. Выход диамина (XVIII) 0,35–0,38 г (75–80%). Полученный продукт был гомогенным по данным ТСХ (R_f 0,28 и 0,47 в системах А и Б соответственно). Найдено, %: С 47,49; Н 9,41; N 27,55. $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$. Вычислено, %: С 47,52; Н 8,99; N 27,70. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3455 (NH_2 , широкая полоса), 1670 ($\text{NHC}=\text{O}$), 1630 (NH_2), 1540 ($\text{CON}-\text{H}$). По сравнению с исходным тетраметиленамином в спектре его диглицильного производного (XVIII) исчезает сильная широкая полоса с тремя максимумами в области 3200–3550 см^{-1} , обусловленная алифатическими аминогруппами.

Авторы глубоко признательны М. А. Грачеву и О. И. Лаврик за постоянный интерес к работе и ценные замечания при подготовке статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lienhard G. E., Secemski I. J. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 3, p. 1121–1123.
2. Lee C., Larsson P. O., Mosbach K. J. Solid-Phase Biochem., 1977, v. 2, p. 31–37.
3. Larsson P. O., Mosbach K. FEBS Lett., 1979, v. 98, № 2, p. 333–336.
4. Hiskey E., Weber L., Baglioni C., Kim Ch., Sarma R. J. Mol. Biol., 1977, v. 109, № 2, p. 173–178.

5. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 611-615.
6. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. FEBS Lett., 1976, v. 70, № 1, p. 105-108.
7. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886-894.
8. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 352-364.
9. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693-1700.
10. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. Мол. биол., 1979, т. 13, № 5, с. 1001-1011.
11. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Biology Reviews. V. 2/Ed. Skulachev V. P. Switzerland: Harwood Acad. Publ., 1981, p. 107-143.
12. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А., Петесов С. В. Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1976, т. 2, вып. 1, с. 117-123.
13. Микельсон А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М.: Мир, 1966, с. 286.
14. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 15-41.
15. Ферит А. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 57-60.
16. Грачев М. А. В кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот / Ред. Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В. М.: Наука, 1973, с. 104-133.
17. Губен-Вейль. Методы органической химии. М.: Химия, 1967, т. 2, с. 201-205.
18. Grindey G. B., Nichol Ch. A. Anal. Biochem., 1970, v. 33, № 1, p. 114-119.
19. Дэвени Т., Грей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1976, с. 272-274.
20. Лаврик О. И., Моор П. А., Невинский Г. А., Ходырева С. Н. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 884-893.

Поступила в редакцию
9.III.1982
После доработки
9.IV.1982

SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE 5'-TRYPHOSPHATE γ -AMIDES, POLYMETHYLENEDIAMINE DERIVATIVES

DOBROBRAVOVA O. V., ZYKOV S. A., MUSTAEV A. A., NEVINSKY G. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the
Academy of Sciences of USSR, Novosibirsk*

The synthesis of polymethylenediamine ATP-derivatives: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NHPPPAdo}$ (n 2-8); $\text{Ado5'PPPNH}(\text{CH}_2)_n\text{NHPPP5'Ado}$ (n 2-8); $\text{Ado5'PPPNH}(\text{CH}_2)_6\text{NHPPP5'Urd}$ and $\text{Ado5'PPPNHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_2\text{NHPPP5'Ado}$ is described. All ATP analogs were characterized by complete and partial acid hydrolyses, UV-spectroscopy, TLC in several systems, and liquid microcolumn chromatography. A possibility of using these compounds for studies on nucleotide binding enzymes is discussed.