

НОВЫЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

B. M. Березовский и P. B. Артемкина

ОГЛАВЛЕНИЕ

I.	Введение	724
II.	Синтез нуклеотидных коферментов фосфохлоридатным методом	725
1.	Аденозин-5'-ди- и аденоzin-5'-трифосфаты	727
2.	Тимидин-5'-ди- и тимидин-5'-трифосфаты	728
3.	Флавинадениндинуклеотид	729
4.	Уридинифосфатглюкоза	730
III.	Синтез нуклеотидных коферментов карбодиимидным методом	732
1.	Ди- и трифосфаты аденоzина и уридина	733
2.	Уридинифосфатглюкоза	735
3.	Флавинадениндинуклеотид	736
4.	Никотинамидадениндинуклеотид	737
5.	Цитидинифосфатхолин	738
IV.	Синтез нуклеотидных коферментов фосфоамидатным методом	741
1.	Ди- и трифосфаты аденоzина и уридина	742
2.	Флавинадениндинуклеотид	745
3.	Уридинифосфатглюкоза	745
4.	Гуанозинидифосфатглюкоза	747
5.	Кофермент А.	748

I. ВВЕДЕНИЕ

Рассмотрение синтетических методов получения нуклеотидных коферментов представляет значительный интерес в связи с той важной ролью, которую они выполняют в процессах метаболизма и особенно в связи с тем, что большинство нуклеотидных коферментов искусственно получено только в последние годы новыми методами синтетической органической химии.

Нуклеотидные коферменты в соединении со специфическим белком образуют многочисленные ферментные системы, в составе которых они катализируют различные химические реакции, протекающие в живом организме. Нуклеотидные коферменты представляют собой мономеры нуклеотидов (фосфорных эфиров нуклеозидов) и структурно подобны или аналогичны фрагментам рибонуклеиновых кислот (РНК), или дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК), являющихся полимерами нуклеотидов.

В основе молекулы нуклеотидных коферментов лежат нуклеозиды — N-гликозиды гетероциклических оснований, связанные по циклическому атому азота с первым углеродным атомом D-рибозы. По характеру связи углевода с гетероциклом все природные нуклеотидные коферменты имеют β -конфигурацию.

Сложные нуклеотидные коферменты можно рассматривать как вещества, построенные из двух более простых соединений, связанных пирофосфатной связью: флавинадениндинуклеотид (ФАД) состоит из аденоzin-5'-фосфата и рибофлавин-5'-фосфата; уридинифосфатглюкоза (УДФГ) — из уридин-5'-фосфата и α -D-глюкозо-1-фосфата; никотин-

амидадениндинуклеотид (НАД)* из аденоzin-5'-фосфата и никотинамидмононуклеотида; никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НЛДФ) * — из аденоzin-2',5'-дифосфата и никотинамидмононуклеотида; кофермент А (КоА) — из аденоzin-3',5'-дифосфата и D-пантетеин-4'-фосфата и т. д.

Среди различных методов получения нуклеотидных коферментов из нуклеозидов или простых нуклеотидов наибольшую сложность и вместе с тем значительный интерес представляют специфические методы создания пирофосфатной связи, которые мы и будем рассматривать в настоящей работе.

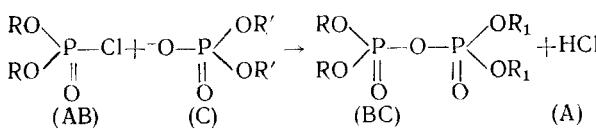
В молекуле простых нуклеотидных коферментов, представляющих собойmonoэфиры полифосфорной кислоты, пирофосфатная связь создается или прямым фосфорилированием нуклеозида, или построением из монофосфата нуклеозида ди- и трифосфатов. В молекуле сложных нуклеотидных коферментов, являющихся несимметричными Р¹, Р²-диэфирами полифосфорной кислоты, пирофосфатная связь создается двумя основными путями: а) конденсацией двух различных нуклеозидмонофосфатов, например, аденоzin-5'-фосфата и рибофлавин-5'-фосфата, никотинамиднуклеозидмонофосфата и аденоzin-5'-фосфата и т. д.; б) конденсацией нуклеозиддифосфата с нефосфорилированным нуклеозидом, как-то: аденоzin-5'-дифосфата и рибофлавина или рибофлавин-5'-дифосфата и аденоzина и т. д.

До настоящего времени преимущественное внимание уделялось изучению методов конденсации двух молекул нуклеозидмонофосфатов. Второй путь создания пирофосфатной связи имеет в литературе весьма ограниченное отражение.

Создание пирофосфатной связи конденсацией двух нуклеозидмонофосфатов осуществляется тремя основными методами: 1) фосфохлоридатным методом, который заключается в конденсации галоидфосфатов или галоиднуклеотидов, имеющих защищенные гидроксильные группы с солями фосфатов или нуклеотидов с последующим удалением защитных групп; 2) карбодиimidным методом, состоящим в непосредственной конденсации двух монофосфатов нуклеозидов, содержащих незащищенные гидроксили, под влиянием карбодиимида (дициклогексилкарбодиимида, ди-*p*-толилкарбодиимида и др.); 3) фосфоамидатным методом, который состоит в конденсации фосфоамидатного производного нуклеозида, имеющего незащищенные гидроксили с другим также незащищенным мононуклеотидом.

II. СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ ФОСФОХЛОРИДАТНЫМ МЕТОДОМ

Фосфохлоридатный метод основан на реакции обмена пирофосфатов или смешанных ангидридов фосфорных кислот или других кислот с фосфатными анионами. Две различные кислоты А и В образуют ангидрид АВ, который вступает в контакт с анионом кислоты С и, если А сильнее, чем В и С, то происходит обмен и образуется свободная кислота А и ангидрид ВС.



* По номенклатуре, рекомендованной Комиссией по ферментам Международного биохимического конгресса и Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии; С. А., 55, 6558 (1961); Биохимия, 26, 563 (1961).

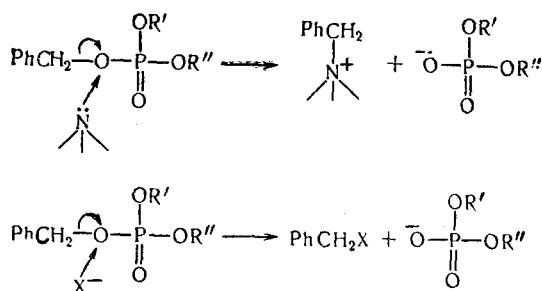
В данном примере В и С — фосфатные анионы, А — хлористый водород, АВ — фосфохлоридат, производный ангидрида фосфорной кислоты и хлористого водорода, ВС — синтезируемый пироfosфат.

Чаще всего при фосфорилировании фосфохлоридатным методом используются полностью или частично этерифицированные фосфаты. Полностью этерифицированные пироfosфаты весьма лабильны и способны легко вступать в реакцию обмена с другими анионами, вследствие чего они являются более активными фосфорилирующими агентами, чем частично этерифицированные фосфаты. Однако, благодаря легкости с которой они вступают во взаимодействие с другими анионами, образуются очень сложные и трудно разделимые смеси. Этим можно объяснить низкие выходы в ряде синтезов.

Необходимое последующее удаление защитных групп на конечных стадиях синтеза приводит к некоторому разрушению пироfosфатной связи, что также снижает выход вещества. Вследствие значительно меньшей склонности частично этерифицированных фосфатов к реакциям обмена, при их применении удается избежать образования побочных продуктов конденсации и тем самым увеличить выход синтезируемых полифосфатов.

Выбор защитных групп и их удаление составляют отдельную проблему. Наиболее употребительными защитными группами являются бензильные группы, так как дебензилирование возможно в относительно мягких условиях. Обычно в качестве фосфорилирующего агента используется дibenзилфосфохлоридат несмотря даже на то, что он менее устойчив и является менее сильным фосфорилирующим агентом, чем, например, дифенилфосфохлоридат.

Традиционный метод дебензилирования — катализическое восстановление над Pt, Pd, Ni-катализаторами в растворе этанола или диоксана. Для дебензилирования используют также восстановление натрием в жидким аммиаке, однако при этом происходит частичное разрушение пироfosфатной связи. Очень удачным методом удаления бензильных групп из фосфатных соединений оказался сольволиз в среде фенола. Избирательное монодебензилирование с успехом может быть достигнуто нуклеофильным замещением в среде четвертичных оснований¹ или анионов (хлоридов, тиоцианатов, йодидов):

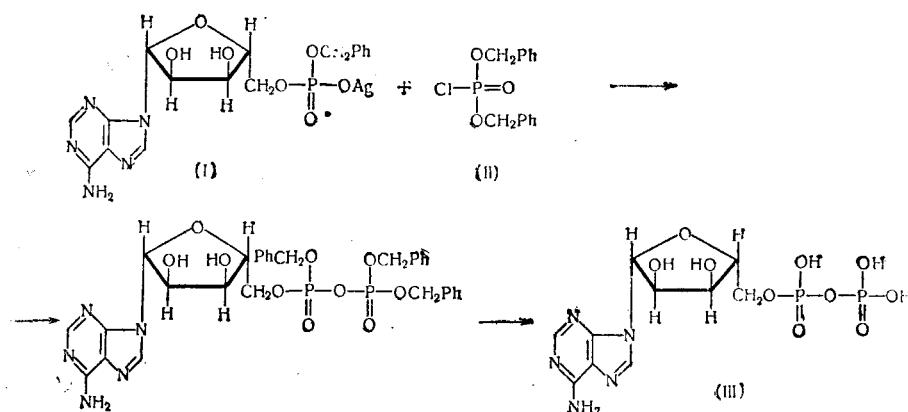


Удаления всех бензильных групп из полностью этерифицированных пироfosфатов не удается достичь, например, при помощи хлорида лития, но можно получить Р¹, Р²-дibenзилдифосфат из тетрабензилдифосфата. Такое не полное дебензилирование удобно применять вследствие того, что частично этерифицированные пироfosфаты более устойчивы в процессе выделения, чем полностью этерифицированные фосфаты. Нежелательное дебензилирование в процессе образования пироfosфатной связи можно подавить применением 2,6-лутидина. Как правило, исходные фосфаты применяются в виде солей с металлами или аминами. Использование фосфатов в виде солей с аминами выгоднее, так как их растворимость значительно лучше. В качестве растворителей применяют безводный бензол, фенол, ацетонитрил или смеси этих растворителей.

1. Аденозин-5'-ди- и аденозин-5'-трифосфат

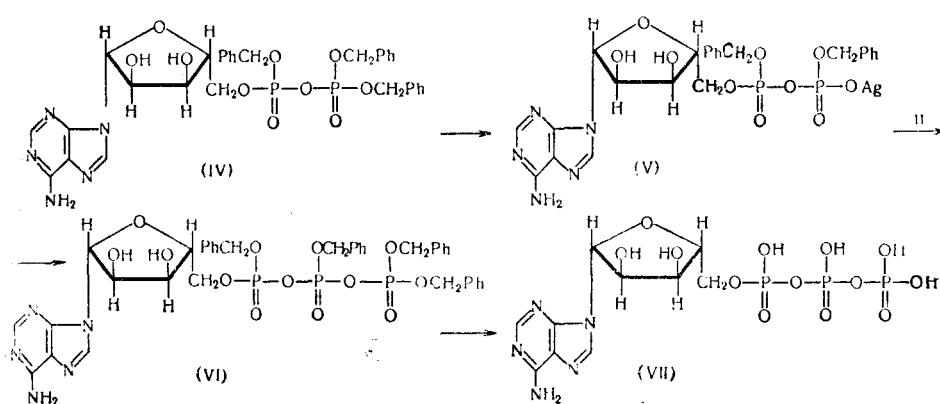
Фосфохлоридатным методом синтеза впервые были получены такие нуклеотидные коферменты как ФАД и УДФГ. Предварительно этим методом был синтезирован ряд простых коферментов — аденозин-5'-диfosfat (АДФ), аденозин-5'-трифосфат (АТФ), уридин-5'-дифосфат (УДФ) и уридин-5'-трифосфат (УТФ), а также ряд симметричных пи-рофосфатов (P^1, P^2 -диаденозин-5'- и P^1, P^2 -диуридин-5'-пи-рофосфаты).

АДФ (III) был получен взаимодействием серебряной соли аденозин-5'-бензилфосфата (I) с дибензилфосфохлоридатом (II) в среде теплой ледяной уксусной кислоты с последующим каталитическим гидрированием получающегося аденозин-5'-трибензилдифосфата в спиртовом растворе². АДФ выделен в виде акридиновой соли с невысоким выходом. Однако его выход может быть увеличен до 55% при использовании вместо ледяной уксусной кислоты смеси фенола и ацетонитрила³.



Ph здесь и далее = C_6H_5 .

В синтезе АТФ (VII) в качестве исходного вещества была использована серебряная соль аденозин-5'-дибензилдифосфата (V), получаемого при монодебензилировании аденозин-5'-трибензилдифосфата (IV)⁴. Соединение V вводили в конденсацию с дибензилфосфохлоридатом (II); реакция приводила к образованию тетрабензилового эфира АТФ (VI)

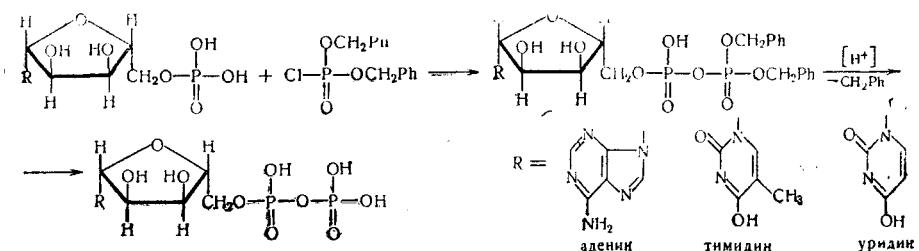


Установлено³, что если восстановление соединения VI проводить в ледяной уксусной кислоте, то продукт реакции получается с содержа-

нием от 7 до 15% АТФ. При использовании в качестве среды смеси фенола и ацетонитрила содержание АТФ возрастает до 40%. Основными примесями оказались АДФ и неорганические полифосфаты. Выделенная триакридиновая соль АТФ идентична такой же соли природного аденоzin-5'-трифосфата.

Основные трудности, встречающиеся в синтезе АДФ и АТФ фосфохлоридным методом, заключаются в подборе условий избирательного монодебензилирования соединения IV. Если для монодебензилирования использовать 4-метилморфоролин, то выход АТФ может быть увеличен почти вдвое³ по сравнению с методом каталитического гидрирования. Однако и в этом случае вещество сильно загрязнено примесями неорганического пирофосфата.

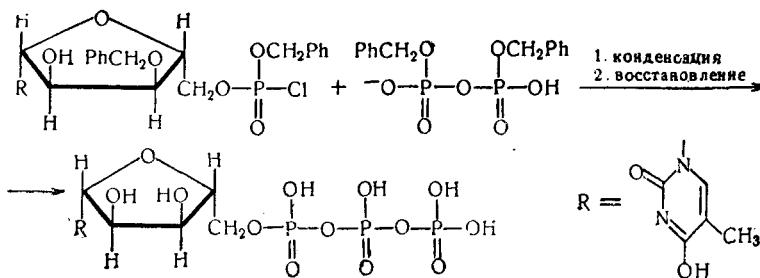
Выходы нуклеозид-5'-дифосфатов могут быть значительно увеличены, если исходить из незащищенных нуклеотидов и действовать на них непосредственно дibenзилфосфохлоридатом (II)⁵⁻⁷. Бензильные группы из образующихся дифосфатных соединений удаляются каталитическим гидрированием. Этим методом были получены в виде кальциевых солей АДФ и УДФ с выходами 80—90%⁶.



2. Тимидин-5'-ди- и тимидин-5'-трифосфаты

Тимидин-5'-дифосфат (ТДФ) получен конденсацией три-*n*-октиламмониевой соли тимидин-5'-фосфата с дibenзилфосфохлоридатом в безводном диоксане при комнатной температуре с выходом 85% и чистотой 92% (в виде кальциевой соли)⁶. В качестве незначительных примесей обнаружены тимидин-5'-фосфат (ТМД) и неорганический фосфат. Бензильные группы удалялись восстановлением.

Взаимодействием 3'-О-бензилтимидин-5'-бензилфосфатом с дифенилтриметиламмониевой солью P¹,P²-дibenзилдифосфата в смеси бензола и ацетонитрила при комнатной температуре с последующим дебензилированием был получен тимидин-5'-трифосфат (ТТФ) с выходом 43%. Методом хроматографии на бумаге установлено, что главным продуктом был ТТФ с небольшой примесью ТМД, неорганических пирофосфатов и следов ТДФ. Разделение образовавшихся при реакции веществ после нейтрализации раствора до pH 6 аммиаком осуществляли на ионообменной смоле Дауэкс-2 (в хлоридной форме). Окончательно ТТФ был очищен через бариевую соль.



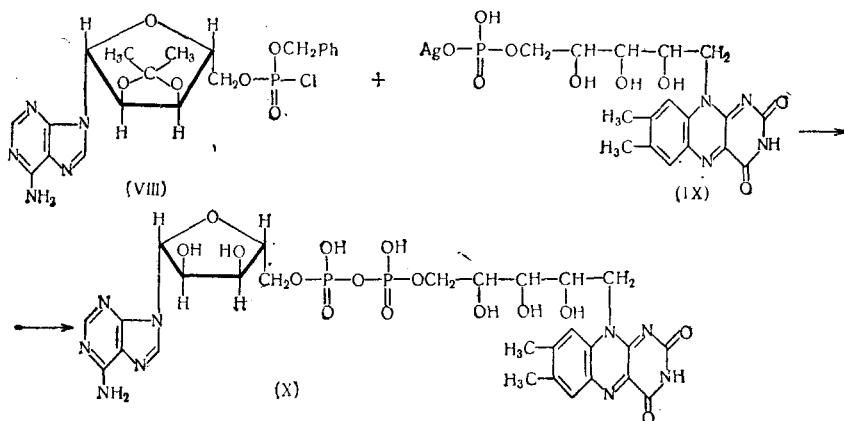
3. Флавинадениндинуклеотид

При изыскании методов синтеза природных несимметричных пирофосфатов (ФАД, УДФГ, НАД, КоА) были получены симметричные пирофосфаты, в частности, такие как P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфат и P^1, P^2 -диуридин-5'-пирофосфат⁸. Результаты этих исследований показали возможность синтетического получения природных несимметричных нуклеотидных коферментов. В последующих работах стремились избежать условий реакции, приводящих к симметричным пирофосфатам.

Первым сложным коферментом, полученным синтетическим путем был ФАД. Один из фрагментов молекулы ФАД — аденоzin-5'-монофосфат (мускульная адениловая кислота АМФ) — синтетически был получен прямым фосфорилированием аденоzина хлорокисью фосфора в пиридине^{9, 10}, а также при обработке 2':3'-О-изопропилиденаденоzина хлорокисью фосфора¹¹, при взаимодействии 2',3'-диацетиладеноzина с дифенилфосфохлоридатом с последующим удалением защитных групп¹², путем фосфорилирования 2':3'-О-изопропилиденаденоzина фосфорной кислотой в присутствии трихлорацетонитрила¹³ и фосфорилированием фосфодихлоридатом¹⁴.

Второй фрагмент молекулы ФАД — рибофлавин-5'-фосфат, обычно называемый флавинмононуклеотидом (ФМН)*, синтезирован несколькими методами: фосфорилированием рибофлавина хлорокисью фосфора с предварительной защитной первичной и вторичных гидроксильных групп^{15—17}; фосфорилированием фосфохлоридатами без предварительной защиты гидроксилов^{18—20}; фосфорилированием метафосфорной кислотой^{21, 22} и алкилфосфохлоридатами также без защиты гидроксильных^{23—26}.

Попытка использовать в качестве промежуточного продукта в синтезе ФАД 4',5'-ангидрибофлавина оказалась неудачной²⁷. Первый успешный синтез ФАД (Х) конденсацией серебряной соли рибофлавин-5'-фосфата (IX) и 2':3'-О-изопропилиденаденоzин-5'-бензилфосфохлоридата (VIII) в присутствии триэтиламина был осуществлен Кристи, Кеннером и Тоддом в 1954 г.^{28, 29}. В качестве растворителя был выбран фенол, так как ФМН хорошо в нем растворим, и в этой среде довольно легко идет образование пирофосфатной связи. Использование этого растворителя представляло еще и те преимущества, что, как выше отмечалось, фенолы способны монодебензилировать образующиеся бензилпирофосфаты. Изопропилиденовая защитная группировка в последующем удалялась кислотной обработкой. Однако выход ФАД составлял всего 6%, что было частично связано с расщеплением образовавшейся пирофосфатной связи при удалении защитных групп

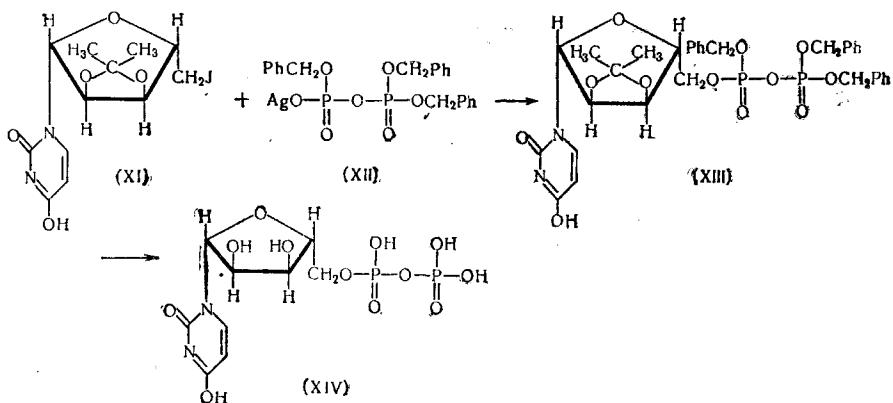


* Рибофлавин-5'-фосфат представляет собой гидрированный нуклеотид.

Выделение коферментов как из природных источников, так и из синтетических продуктов, всегда представляло собой сложную и трудоемкую работу. С развитием хроматографической техники, которая в последние годы получила широкое распространение в органической химии, стало возможным более эффективное выделение и разделение нуклеотидных коферментов. Например, для выделения и очистки ФАД были применены разнообразные методы: частичное разделение флавиновых нуклеотидов может быть достигнуто на ионообменной смоле IRC-50 в то время как вообще анионообменные смолы очень сильно их адсорбируют. С лучшими результатами была использована адсорбционная хроматография на фторизоле⁸, распределительная хроматография в системе фенол — бутанол — вода³⁰, хроматография на бумаге³¹, колоночный электрофорез^{32, 33} и хроматография на порошке целлюлозы^{34—36}, последний метод оказался наиболее эффективным. Для идентификации флавиновых соединений использовалась хроматография на бумаге в различных системах растворителей^{37, 38}.

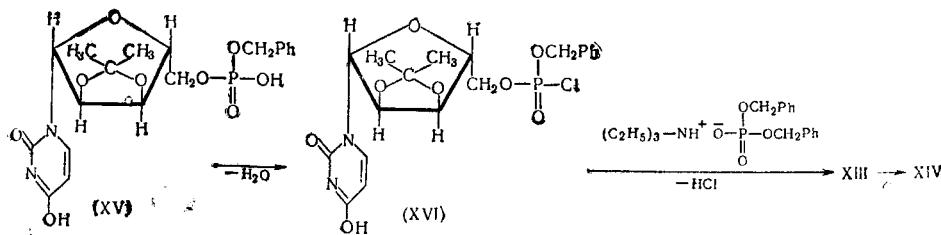
4. Уридинифосфатглюкоза

Одним из продуктов расщепления УДФГ оказался УДФ, синтез которого был осуществлен конденсацией 2':3'-O-изопропилиден-5'-дезокси-5'-йодуридуна (XI) с серебряной солью трибензилдифосфата (XII) в растворе бензола³⁹. Получаемый с хорошим выходом 2':3'-O-изопропилиденуридин-5'-трибензилдифосфат (XIII) подвергался дебензилированию хлористым литием в 2-этоксигексаноле в уридин-5'-дibenзилдифосфат. Использование хлористого лития для дебензилирования оказалось очень удобным, так как позволяло вести реакцию в мягких условиях⁴⁰. Хотя таким путем и нельзя было удалить все защитные группы, тем не менее эта реакция имела важное значение, так как частично дебензилированное вещество оказалось более устойчивым в кислой среде, чем полный эфир этого соединения. Благодаря этому облегчалось дальнейшее удаление оставшихся бензильных групп катализитическим гидрированием с последующим отщеплением изопропилиденовых групп мягким кислым гидролизом:

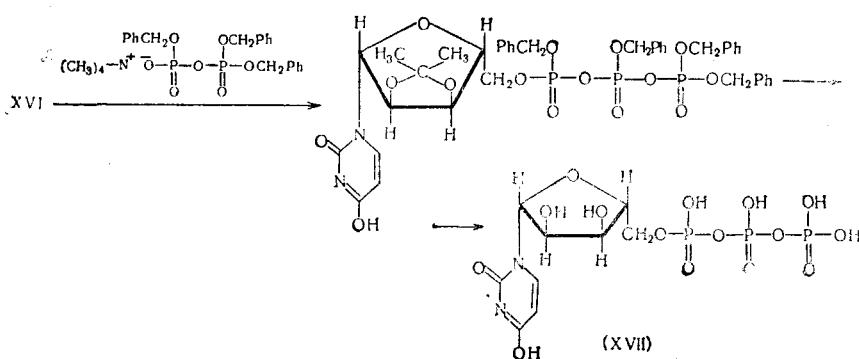


УДФ (XIV) может быть также синтезирован взаимодействием 2':3'-O-изопропилиденуридин-5'-бензилфосфохлоридата (XVI) с триэтиламмониевой солью дифосфата⁴¹ с последующим дебензилированием и деизопропилиденизацией промежуточного вещества аналогично описанному выше. Соединение XVI получают из 2':3'-O-изопропилиденуридин-5'-монообензилфосфата (XV) обработкой его N-хлорсук-

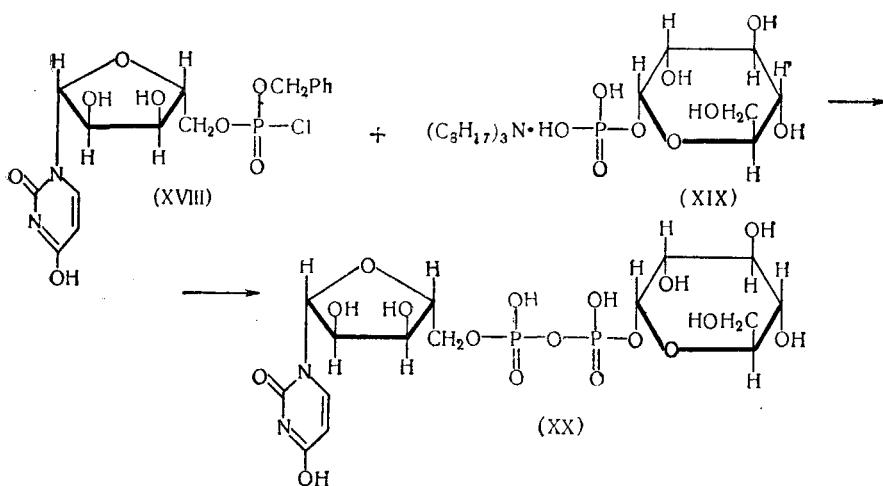
цинимидом. УДФ (XIV) выделен в виде бариевой соли с выходом 25%; применение фенолов в качестве частично дебензилирующих средств значительно увеличивает его выход⁴²:



УТФ (XVII), участвующий, по-видимому, в энзиматическом синтезе уридиновых производных⁴³, был получен конденсацией соединения XVI с тетраметиламмониевой солью трибензилдифосфата⁴². Частичное дебензилирование промежуточного вещества осуществлялось при помощи *m*-крезола в присутствии небольших количеств соляной кислоты с последующим удалением оставшихся бензильных групп каталитическим гидрированием и деизопропилиденизацией обычным методом:



В реакционной смеси после обработки ее гидратом окиси лития содержалось ~ 37% УТФ в виде литиевой соли. Чистая бариевая соль УТФ выделена с выходом 29% в результате хроматографической очистки на угле или на ионообменной смоле Даэкс-2.



УДФГ (XX) была получена конденсацией 2',3'-дibenзилуридин-5'-бензилфосфохлоридата (XVIII) с три-*p*-октиламмониевой солью α -D-глюкозо-1-фосфата (XIX) в присутствии три-*p*-бутиламина в бензole⁴⁴. Тем же методом была получена и уридинифосфатгалактоза.

Выбор бензильной группы вместо изопропилиденовой для защиты гидроксилов объясняется значительно большей лабильностью УДФГ в кислой среде, чем, например, ФАД, где применяется изопропилиденовая защита, так как деизопропилиденизация продукта конденсации осуществляется в кислой среде. Бензильные группы после образования пирофосфатной связи удаляли катализитическим гидрированием.

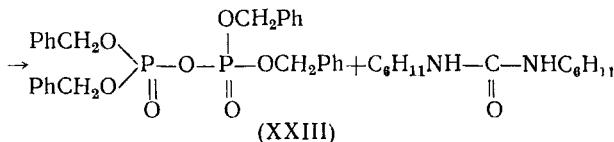
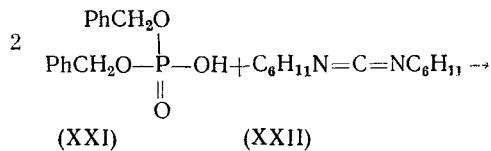
УДФГ была выделена в виде кальциевой соли с содержанием 30% и общим выходом 15%. В качестве основных примесей были УМФ и α -D-глюкозо-1-фосфат. В результате дальнейшей очистки была получена кальциевая соль УДФГ с чистотой 92% (по энзиматическому анализу).

Рассмотренный фосфохлоридатный метод образования пирофосфатной связи, несмотря на кажущуюся специфическую направленность, обладает рядом существенных недостатков; а именно: 1) благодаря необходимости защиты гидроксильных групп нуклеозида метод становится многостадийным; 2) удаление защитных групп после конденсации всегда сопровождается частичным расщеплением образовавшейся пирофосфатной связи, вследствие чего нуклеотидные коферменты получаются с низкими выходами; 3) трудоемкий синтез исходных фосфохлоридатов вызывает дополнительные усложнения.

Низкие выходы связаны также с тем, что полностью этерифицированные пирофосфаты легко вступают в реакцию обмена, что приводит к сложным и трудно разделимым смесям^{45, 46}.

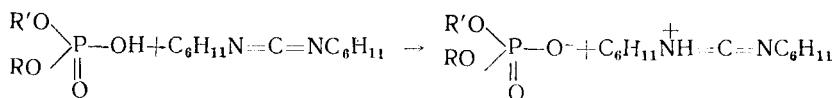
III. СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ КАРБОДИИМИДНЫМ МЕТОДОМ

В поисках более специфичного и простого метода синтеза нуклеотидных коферментов была изучена конденсация двух нуклеотидов в присутствии таких конденсирующих агентов, как дициклогексилкарбодиимид, ди-*p*-толилкарбодиимид и др. Этот метод был проверен сначала на синтезе бензиловых эфиров пирофосфорной кислоты⁴⁷. Реакция между дibenзилфосфатом (XXI) и дициклогексилкарбодиимидом (дЦК) (XXII) в безводном пиридине идет мгновенно с образованием тетрабензилпирофосфата (XXIII) и NN'-дициклогексилмочевины. При исследовании влияния количества воды на выход тетрабензилпирофосфата было установлено, что даже значительный избыток воды не мешает образованию смешанного ангидрида фосфорной кислоты и выход во всех случаях был ~50%.

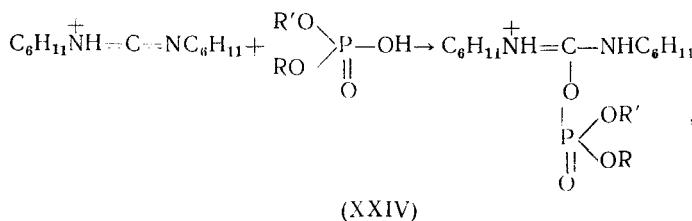


В этом заключается большая ценность карбодиимидного метода, так как даже незначительное количество воды сильно увеличивает растворимость нуклеотидов и ортофосфорной кислоты, нерастворимых в безводном пиридине, который обычно применяется в качестве среды.

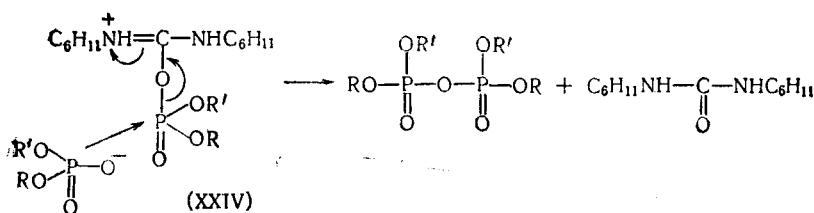
Реакция образования пирофосфатной связи, по-видимому, заключается в первоначальном присоединении протона к ДЦК^{48, 49}:



с последующим присоединением к протонированному ДЦК молекулы фосфорной кислоты или фосфорного эфира и получением аддукта типа промежуточного соединения XXIV⁴⁹⁻⁵²:



которое далее атакуется фосфорноэфирным анионом с образованием пирофосфата и замещенной мочевины. Из реакционной смеси промежуточное соединение выделено не было.



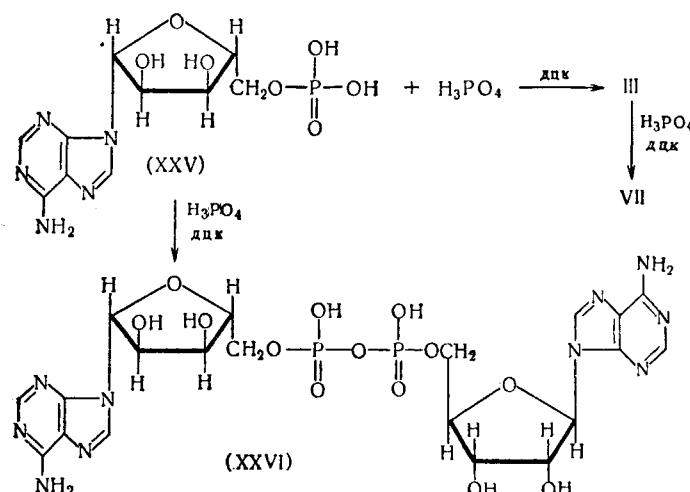
Образование пирофосфатной связи возможно только с карбодиимирами в протонированной форме, когда под влиянием протона при атаке фосфатным анионом промежуточного аддукта XXIV разрывается в этом аддукте связь O—P, а не связь C—O, и завязывается новая связь O—P образующегося пирофосфата.

Известно, что карбодиимиры в нейтральных условиях довольно легко реагируют с кислотами⁴⁹. В присутствии оснований, особенно три-*n*-бутиламина, скорость реакции значительно снижается вследствие уменьшения концентрации протонированного карбодиимида и промежуточного соединения XXIV. В пиридине реакции идут с большой скоростью, что объясняется, очевидно, достаточной основностью карбодиимида по сравнению с пиридином, с которым он способен конкурировать.

Исходные вещества для конденсации в присутствии карбодиимидов берут в виде свободных кислот с незащищеннымными гидроксильными группами или в виде их солей с пиридином или с триалкиламиналами. В качестве растворителя, помимо пиридинина, содержащего умеренные количества воды, используют диметилформамид. Присутствие значительных количеств воды нежелательно, так как это вызывает необходимость применения большого избытка карбодиимида.

1. Ди- и трифосфаты аденоцина и уридила

Был предпринят одностадийный синтез АДФ (III) и АТФ (VII) из АМФ (XXV) и 85%-ной ортофосфорной кислоты в присутствии избытка ДЦК в водном пиридине⁵³:



Выделение АДФ и АТФ из реакционной смеси включает в себя осаждение их ртутных солей при низком рН реагентом Ломана ($100\text{ г Hg(NO}_3)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 25 мл воды, 25 мл концентрированной азотной кислоты) и дальнейшее разделение на ионообменной смоле Дауэкс-2. АДФ и АТФ были выделены в виде бариевых солей с общим выходом 33%. Последующую очистку осуществляли через ртутные соли по методу Ле Паж⁵⁴. Для идентификации пользовались бумажной хроматографией в различных системах растворителей. Методом ионообменной хроматографии было определено, что полученный АДФ содержит примесь АТФ (до 2%), а АТФ, в свою очередь, примесь АДФ (до 5%).

Применение небольшого избытка 85%-ной ортофосфорной кислоты приводит к образованию значительного количества (до 55%) симметричного P^1,P^2 -диаденозин-5'-пироfosфата (XXVI). Так как при получении природных несимметричных нуклеотидных коферментов присутствие в реакционной смеси симметричных пирамиофосфатов нежелательно, то были изучены условия, при которых образование побочных веществ сводилось бы к минимуму. Выяснено, что при использовании пятикратного молекулярного избытка 85%-ной ортофосфорной кислоты получается лишь ~10% P^1,P^2 -диаденозин-5'-пирамиофосфата; десятикратный избыток 85%-ной ортофосфорной кислоты почти полностью подавляет реакцию образования этого вещества, однако, при этом трудно получить гомогенную смесь реагентов.

Аналогичным образом из УМФ и 85%-ной ортофосфорной кислоты в присутствии дцк в водном пиридине при комнатной температуре были получены УДФ и УТФ⁵⁵; реакция протекает с большой скоростью. Увеличение продолжительности реакции нежелательно, так как это может привести к образованию большого количества органических и неорганических полифосфатов. Значительный избыток ортофосфорной кислоты также нежелателен, так как связан с получением высших неорганических полифосфатов. Выделение уридинфосфатов избирательным осаждением при различных рН в виде бариевых, магниевых и ртутных солей оказалось безуспешным. Непосредственной очисткой на ионообменных смолах не удалось получить УТФ с содержанием выше 50%. Наиболее удовлетворительным оказалось выделение смеси УДФ и УТФ из реакционной массы пропусканием ее через ионообменную смолу Дауэкс-50; последующее разделение нуклеотидов производили на смоле Дауэкс-2. УДФ и УТФ выделены в виде бариевых солей. Несмотря на значительные потери, выход УДФ составлял 20—25% (содержание 98%), а УТФ — 20% (содержание 96%).

Карбодиимидным методом путем взаимодействия ФМН с 85%-ной ортофосфорной кислотой в присутствии ДЦК был получен рибофлавин-5'-дифосфат⁵⁶, а из уридин-5'-фосфата — симметричный Р¹,Р²-диуридин-5'-пироfosфат⁸.

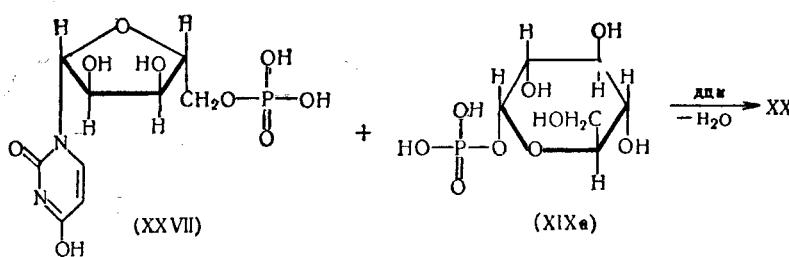
Как выше указывалось, ценность карбодиимидного метода создания пироfosфатной связи заключается в возможности проведения реакции в водном пиридине. Тем не менее во многих случаях не удается добиться гомогенности раствора нуклеотида и ДЦК, чем, вероятно, и объясняются относительно низкие выходы синтезируемых коферментов. Поэтому были сделаны попытки использовать более полярный воднорастворимый карбодиимид⁵⁷: (C₂H₅)₂N(CH₃)(CH₂)₃—N=C=NC₆H₁₁, который применялся в конденсации с АМФ в Р¹,Р²-диаденозин-5'-пироfosфат⁵⁷. Установлено, что скорость реакции в гомогенных растворах увеличивается, но наличие водной среды вызывает необходимость применения очень большого избытка карбодиимида.

Как оказалось, триалкиламмониевые соли способствуют увеличению растворимости фосфорных эфиров в безводных растворителях: причем, для получения нуклеозидполифосфатов можно использовать триалкиламмониевые соли карбодиимидов наряду с триалкиламмониевыми солями ортофосфорной кислоты. Так, при конденсации уридин-5'-фосфата в смеси пиридина, три-*n*-бутиламина и ДЦК с количественным выходом получается Р¹,Р²-диуридин-5'-пироfosфат⁵⁷. Для синтеза нуклеозид-5'-трифосфатов использовался ДЦК и 85%-ная ортофосфорная кислота в безводном пиридине в присутствии двух эквивалентов три-*n*-бутиламина; УТФ получен с выходом ~65%, АТФ с выходом ~40%⁵⁷.

Последний вариант карбодиимидного метода может быть во многих случаях рекомендован для препаративного получения нуклеозид-5'-трифосфатов.

2. Уридинифосфатглюкоза

Известный интерес для получения весьма неустойчивой к кислотам и щелочам УДФГ представлял метод прямой конденсации, незащищенных исходных фосфатов, так как этот метод исключал необходимость применения кислых или щелочных сред, используемых при удалении защитных групп. УДФГ (XX) была получена конденсацией УМФ (XXVII) с α-*D*-глюкозо-1-фосфатом (XIXa) под влиянием ДЦК⁵⁸. Применили следующее соотношение реагирующих компонент: 1 моль пиридиновой соли УМФ, 1,9 моля пиридиновой соли α-*D*-глюкозо-1-фосфата и 1,7 моля ДЦК в среде диметилформамида; в результате реакции получалась сложная смесь веществ, содержащая только ~3,5% УДФГ.

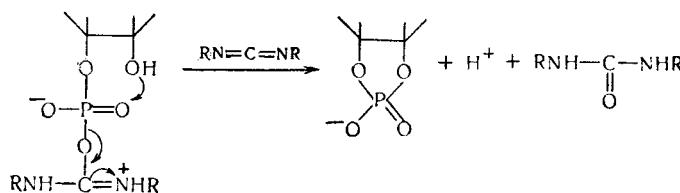


Анионообменная хроматография для разделения веществ, находящихся в реакционной смеси, оказалась не подходящей, так как УДФГ, по-видимому, разлагалась на ионообменной смоле. Более эффективным было применение хроматографии на активированном угле. Одна из фракций содержала ~42% аммониевой соли УДФГ, которая была идентична природному коферменту. Однако общий выход вещества был низ-

ким. Оказалось, что реакция сопровождается образованием значительных количеств циклического α -D-глюкозо-1':2'-фосфата⁵⁸.

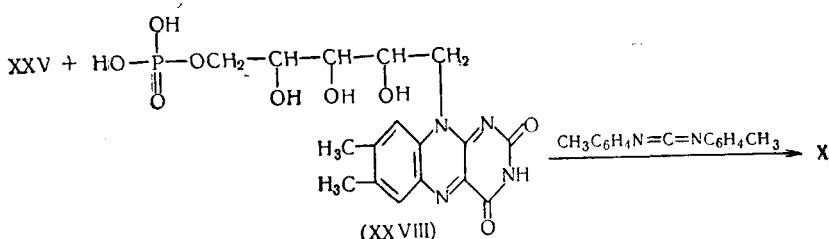
Такой же результат наблюдался при реакции уридин-2'- или уридин-3'-фосфата с ДЦК в водном пиридине, когда получался циклический уридин-2':3'-фосфат, а из дрожжевой адениловой кислоты (смесь аденоzin-2'- и аденоzin-3'-фосфатов) в тех же условиях получался циклический аденоzin-2':3'-фосфат⁵⁴. Наряду с этим даже при продолжительном воздействии ДЦК на АМФ циклический фосфат не образуется, но в то же время с хорошим выходом получается симметричный P^1, P^2 -диаденоzin-5'-пирофосфат⁵³.

Направление реакции в сторону образования циклических фосфатов, по-видимому, связано с *cis*-конфигурацией гидроксильной и фосфатной групп в таких соединениях, как аденоzin-2'- и аденоzin-3'-фосфаты, и уридин-2'- и уридин-3'-фосфаты, благодаря чему создаются благоприятные условия для внутримолекулярной циклизации⁴⁹

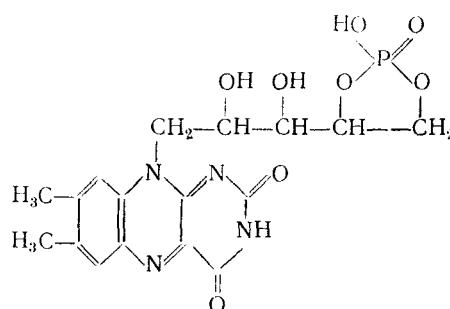


3. Флавинадениндинуклеотид

ФАД (Х) был получен из ФМН (XXVIII) и АМФ (XXV) в водном пиридине в присутствии ди-*p*-толилкарбодиимида³¹. Реакцию проводили в темноте в течение 24 часов, после чего образовавшаяся ди-*p*-толилмочевина была отфильтрована и кофермент выделен из реакционной смеси хроматографией на бумаге с последующей очисткой через ураниловую соль⁵⁹. Выход составил ~4% и чистота 90%. Для выделения была использована система *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5); в этой системе ФАД имеет R_f 0,12. Для очистки применяли систему трет.-бутанол — вода (60:40), в которой ФАД имеет R_f 0,40.



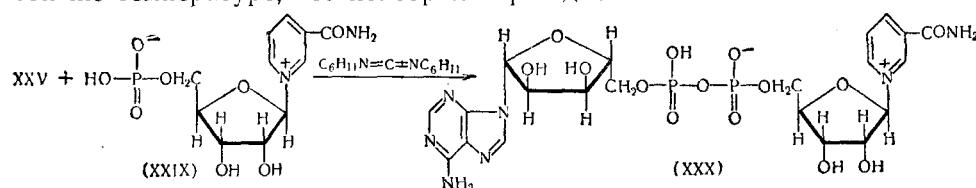
Среди продуктов реакции, как и ожидалось, был найден в большом количестве циклический рибофлавин-4':5'-фосфат. Это находится в соответствии с известными данными о направлении реакции с ДЦК, часто приводящей к циклическим нуклеотидам^{60, 61}. Так, при взаимодействии ФМН с АМФ (XXV) в присутствии ДЦК единственным продуктом реакции оказался циклический рибофлавин-4':5'-фосфат¹⁷:



Низкий выход ФАД, синтезируемого карбодиимидным методом, связан с тем, что основная реакция направляется в сторону образования циклического монофосфата благодаря *цис*-конфигурации гидроксильных групп по отношению к фосфату.

4. Никотинамидаденидинуклеотид

Синтезу этого кофермента посвящено немного работ. Никотинамидмононуклеотид (XXIX) нерастворим в безводном пиридине или диметилформамиде, наименее употребительных растворителях, применяемых в синтезах нуклеотидкоферментов карбодиимидным методом, поэтому при получении НАД (XXX) из АМФ (XXV) и никотинамидмононуклеотида (XXIX) был использован водный пиридин в присутствии избытка ДЦК⁶²; реакция проводилась при 0°. После отделения образовавшейся дициклогексимолочевины снова добавляли ДЦК и реакция продолжалась при той же температуре; это повторяли трижды.



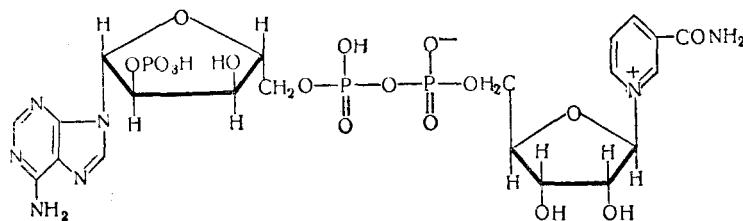
Методом хроматографии на бумаге в реакционной смеси обнаружено присутствие НАД, двух симметричных пирофосфатов (P^1, P^2 -диникотинамиднуклеозид-5'-пирофосфата и P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфата) и небольших количеств исходных веществ. Около 50% никотинамиднуклеотида превращалось в НАД и только примерно десятая часть в симметричный P^1, P^2 -диникотинамиднуклеозид-5'-пирофосфат.

Разделение веществ, содержащихся в реакционной смеси, проводили на ионообменной смоле Дауэкс-2. Водные фракции содержали никотинамиднуклеотид и симметричный P^1, P^2 -диникотинамиднуклеозид-5'-пирофосфат, а НАД удерживался на смоле вместе с АМФ и P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфатом. НАД вымывался со смолы 0,01 N муравьиной кислотой, АМФ — 0,1 N муравьиной кислотой и P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфат — 1 N муравьиной кислотой. В результате ионообменной хроматографии НАД был выделен в виде аморфного порошка с содержанием в нем ~ 70% кофермента.

В реакцию были взяты α - и β -анамеры никотинамиднуклеотида (приблизительно в соотношении 80:20), поэтому в результате конденсации получалась смесь α - и β -анамерных форм кофермента, которые трудно было разделить на ионообменных смолах. Для разделения анамеров был использован изящный способ восстановления НАД спиртовой дегидрогеназой в дигидро-НАД с последующей щелочной обработкой, с целью расщепления α -анамера. Полученный таким путем НАД был идентичен природному, как это следовало из результатов хроматогра-

фии на бумаге и электрофореза. По оптическим данным ($[\alpha]_{D} + 31,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$) и энзиматической активности образец был 90%-ной чистоты.

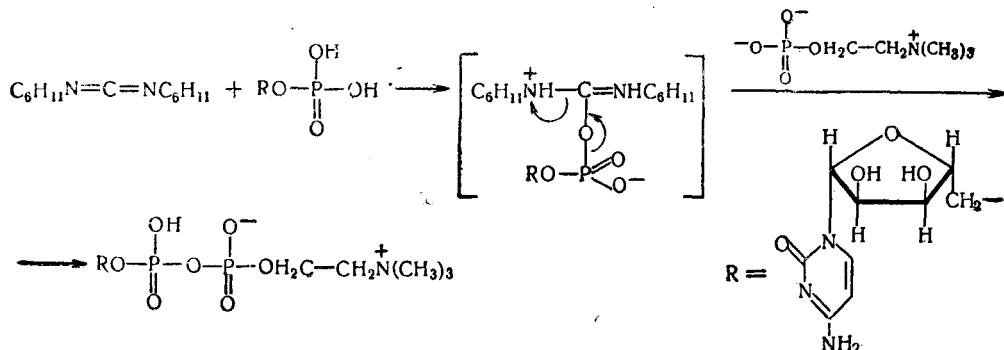
Подобным же методом был синтезирован никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) из аденоzin-2' (3'), 5'-дифосфата и никотинамидмононуклеотида в присутствии ДЦК в водном пиридине. НАДФ был выделен на колонке с ионообменной смолой Дауэкс-50 и, по данным электрофореза на бумаге, содержал небольшие примеси никотинамидмононуклеотида и аденоzin-2', 5'- и аденоzin-3', 5'-дифосфатов.



Объяснение высокого выхода НАД (XXX), так же как и цитидиндифосфатхолина (см. ниже), которые получаются со значительно более высоким выходом, чем ФАД и УДФГ, можно найти в следующем. Как никотинамидмононуклеотид, так и фосфатхолин имеют характер двойного иона и являются поэтому более слабыми нуклеофильными агентами, чем анионы аденоzin-5'-фосфата и цитидин-5'-фосфата. Поэтому аддукт типа промежуточного соединения XXIV (см. стр. 733) будет преимущественно образовываться за счет атаки протонированного карбодиимида аденоzin-5'-фосфатом или цитидин-5'-фосфатом, а не за счет никотинамидмононуклеотида или фосфатхолина, соответственно. Последующая атака на электрофильный фосфор фосфаткарбодиимидного аддукта типа соединения XXIV возможна как со стороны аниона никотинамидмононуклеотида или фосфатхолина, так и со стороны аниона аденоzin-5'- и цитидин-5'-фосфатов. Это приводит к образованию синтезируемого несимметричного пирофосфата и некоторых количеств побочных симметричных пирофосфатов: Р¹,Р²-диаденоzin-5'-пирофосфата, Р¹,Р²-дицитидин-5'-пирофосфата, следов Р¹,Р²-диникотинамиднуклеозид-5'-пирофосфата, но не Р¹,Р²-дихолинпирофосфата.

5. Цитидиндифосфатхолин

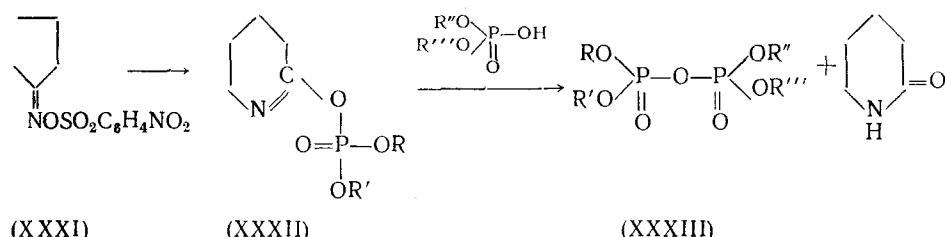
Цитидиндифосфатхолин был получен взаимодействием цитидин-5'-фосфата и фосфатхолина в водном пиридине в присутствии избытка ДЦК при комнатной температуре⁶³. Продукты конденсации разделялись на ионообменной смоле Дауэкс-1 (в формиатной форме). Выход составил 46%.



Карбодиимидным методом были также синтезированы аденоzinидифосфатхолин (выход 30—40%), уридинидифосфатхолин (30—40%), гуанозинидифосфатхолин (30—40%)⁶³, а также цитидинидифосфатглицерин⁶⁴, цитидинидифосфатрибит⁶⁵ и цитидинидифосфэтаноламин с умеренными выходами.

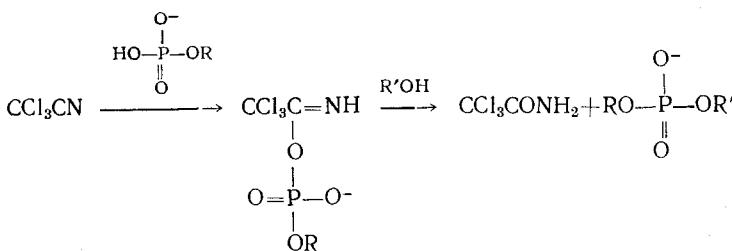
Для создания пирофосфатной связи наряду с карбодиимидами были использованы такие реагенты, как производные имидоилфосфатов^{66—68}, тригалоидидацетонитрила^{13, 49, 51}, изоцианата⁶⁹ и цианамидов⁷⁰, которые с ортофосфорной кислотой или ее эфирами реагируют по аналогичному механизму, характерному для карбодиимидов, образуя родственные промежуточные соединения.

Например, производные имидоилфосфата (XXXII)^{66—68}, структурно построенные аналогично промежуточному соединению XXIV (стр. 733), получаются в результате бекмановской перегруппировки *p*-нитробензолсульфоната циклопентаноноксима (XXXI) и в результате взаимодействия с диэфирами ортофосфорной кислоты приводят к образованию тетраэфира пирофосфорной кислоты (XXXIII):



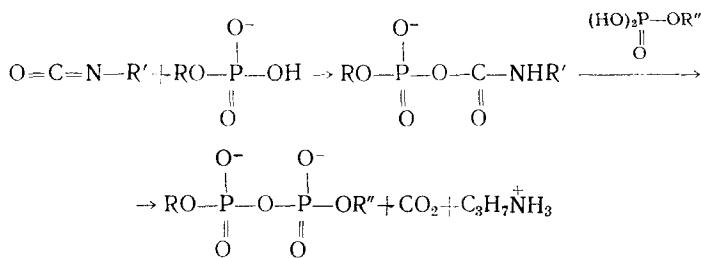
Таким методом УДФ был получен в результате взаимодействия тетра-*n*-бутиламмониевой соли бензил-2':3'-изопропилиденуридин-5'-фосфата и соединения XXXI с последующей обработкой промежуточного вещества XXXII дibenзилфосфатом; выход составил 40%. Однако и этот метод не обладает строгой специфичностью в синтезах нуклеотидных коферментов.

Производные имидоилфосфата, которые образуются из трихлорацетонитрила при действииmonoэфиров ортофосфорной кислоты в присутствии пиридина¹³, способны со спиртами давать несимметричные диэфиры ортофосфорной кислоты, а с monoэфирами фосфорной кислоты — пирофосфаты:



Описано получение с этим реагентом монобензилфосфата и ди-*p*-хлорфенилилирофосфата.

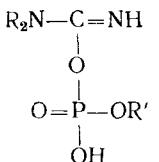
Изоцианаты⁶⁹ в реакциях с ортофосфорной кислотой или ее monoэфирами дают карбамилфосфаты^{71, 72}, которые далее с monoэфирами фосфорной кислоты образуют пирофосфаты:



где $R = C_6H_5$; $R' = C_3H_7$.

Этим методом при помощи диметилцианамида был осуществлен синтез Р¹-аденозин-5'-Р²-уридин-5'-пироfosфата⁷⁰.

Реакционноспособный аддукт типа

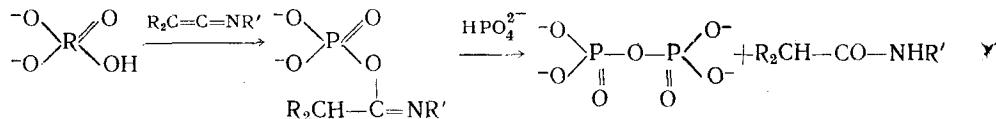


структурно подобный промежуточному соединению XXIV (стр. 733), через который, по-видимому, протекает реакция с карбодиимидами образуется из диалкилцианамида иmono- идиэфиров ортоfosфорной кислоты⁷⁰. Следует отметить, что таутомерная форма замещенных цианамидов построена по типу карбодиимидов:



Этим методом из циан-5'-моноfosфата взаимодействием с водным раствором диметилицианамида был получен цитидин-5'-дифосфат с выходом 40%.

Дифенилкетен-*p*-толуидин и диметилсульфанилкетенметилимид с дифенил- и дифенилфосфатами способны давать симметричные и несимметричные пирофосфаты⁷³.



где $R = C_6H_5$; SO_2CH_3 ; $R' = C_6H_4CH_3$; CH_3 .

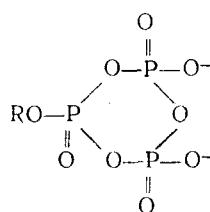
Дифенилкетен-*p*-толуидин с дibenзилфосфатом в бензоле образует тетрабензилпироfosфат с выходом 44%⁷³.

Диметилсульфанилкетенметилимид при обработке эквимолекулярной смесью дибензил- и дифенилfosфатов дает преимущественно несимметричный Р¹-дибензил-Р²-дифенилпирофосфат⁷³.

Описанные выше реагенты, применяемые для получения пирофосфатов, пока еще не нашли широкого применения в области синтеза нуклеотидных коферментов.

Таким образом, карбодиимидный метод конденсации выгодно отличается от фосфохлоридного метода, во-первых, тем, что его проводят в одну стадию без предварительной защиты гидроксильных групп нуклеозида, во-вторых, он удобен для проведения реакции в среде, содержащей воду. В то же время карбодиимидный метод не всегда дает возможность получить гомогенные растворы реагентов. Образование циклических фосфатов исходных нуклеотидов (например, при синтезе ФАД, УДФГ) также накладывает значительные ограничения на этот метод. К тому же в ряде случаев с карбодиимидаами получаются побочные симметричные пирофосфаты. Все это определяет невысокие выходы синтезируемых нуклеотидных коферментов.

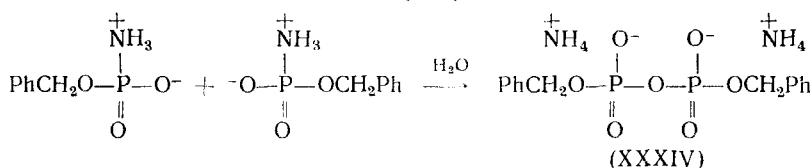
Однако карбодинимидный метод во многих случаях может быть рекомендован для препаративного получения нуклеозид-5'-трифосфатов. Преимущественное образование трифосфатов, возможно, является следствием гидролиза циклического метаfosфата, устойчивого во время реакции, но превращающегося в линейный фосфат в процессе выделения:



IV. СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ ФОСФОАМИДНЫМ МЕТОДОМ

Усилия исследователей были направлены на поиски таких производных фосфорной кислоты и ее эфиров, которые были бы легко доступны, достаточно реакционноспособны, устойчивы в условиях проведения опыта и обладали бы специфичностью в синтезе нуклеотидных коферментов.

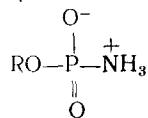
Так, например, было замечено, что при фосфорилировании спиртов моноbenзилфосфоамидатом вместо предполагаемых фосфорных эфиров спирта была получена диаммониевая соль P^1R^2 -дибензилпирофосфата (XXXIV)⁷⁴. Такое же соединение получалось при продолжительном хранении (около 5 лет) моноbenзилфосфоамидата:



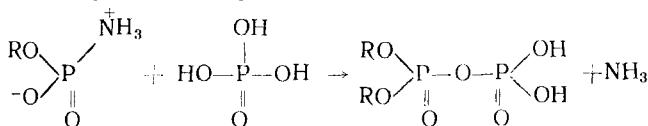
Эти наблюдения навели на ту мысль, что моноэфиры амида ортофосфорной кислоты могут реагировать с фосфатными анионами с образованием пирофосфатной связи; при этом не происходит фосфорилирования спиртовых гидроксильных групп молекулы, вследствие чего фосфоамидаты могут быть использованы для синтеза несимметричных динуклеотидов.

Незначительная активность фосфоамидатов по отношению к спиртовым гидроксильным группам позволяет использовать незащищенные нуклеотиды и тем самым избежать реакций обмена, возможных при наличии полностью этирифицированных пирофосфатов, как это наблюдалось при фосфохлоридатном методе.

Методом кристаллографического анализа было показано⁷⁵, что моноэфиры фосфоамидов кислот имеют характер двойного иона, где атом азота несет положительный заряд:



Такое соединение способно реагировать с нуклеофильным фосфатом с образованием пиро- и полифосфатов:



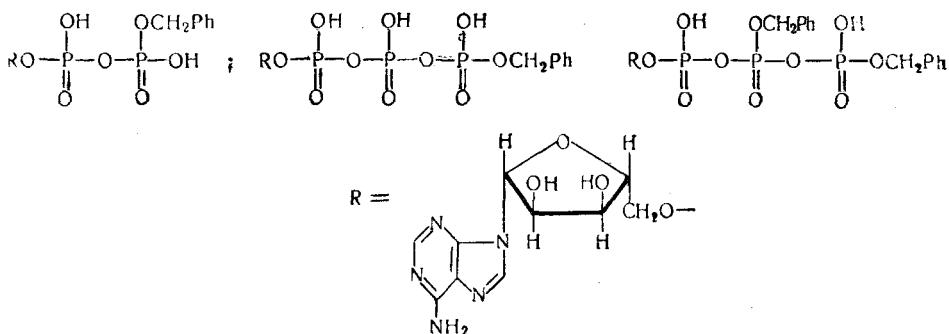
Реакция фосфорилирования гладко протекает в присутствии пиридина или триалкиламинов. Исходные вещества чаще всего используются в виде солей с металлами (калий, натрий) и органическими основаниями (пиридин, триалкиламины). Эти соли хорошо растворимы в формамиде, диметилформамиде, пиридине, *o*-хлорфеноле и смеси пиридина и *o*-хлорфенола — растворителях, наиболее часто употребляемых в этом методе.

1. Ди- и трифосфаты аденоцина, урицина, цитидина

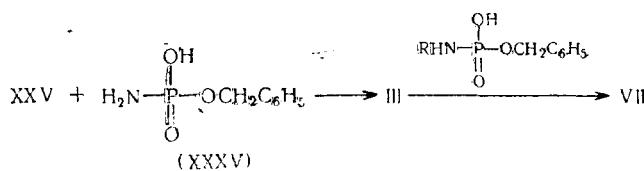
При взаимодействии дипиридиновой соли АМФ (XXV) с бензилфосфоамидатом (XXXV)⁷⁴ в диметилформамиде, содержащем 5% воды, при 100° был получен монобензиловый эфир аденоцин-5'-дифосфата, из которого после каталитического отщепления бензильной группы образуется с 48%-ным выходом АДФ (III), выделяемый в виде литиевой соли.

В безводной среде возникает побочная реакция, приводящая к образованию незначительного количества Р¹,Р²-диаденоцин-5'-пироfosфата. Присутствие небольшого количества воды полностью подавляет эту реакцию, правда, при этом выход АДФ не высокий и большая часть АМФ остается неизменной.

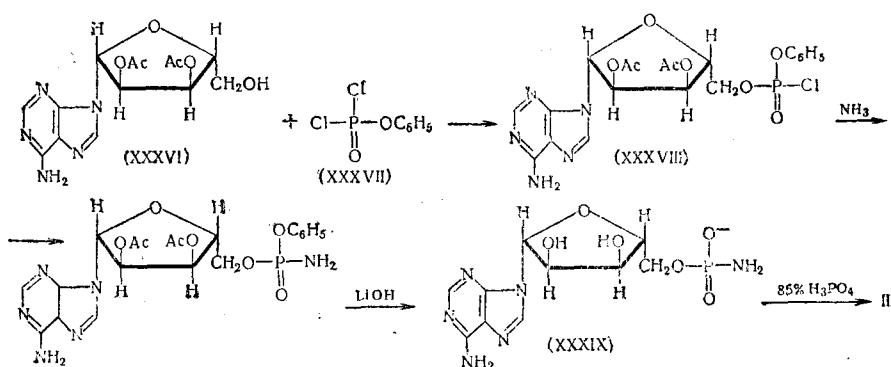
В результате последующей реакции АДФ с соединением XXXV или с N-бензил- или N-циклогексилфосфоамидатами был получен АДФ (III) с выходом 71% с примесью незначительного количества высших полифосфатов аденоцина. Присутствие лишь небольших количеств полифосфатов объясняется лабильностью бензиловых эфиров полифосфатов по сравнению со свободными полифосфорными кислотами и моноэтерифицированными фосфатами. Так, например, при выделении оказалось, что монобензиловые эфиры АДФ и АТФ достаточно устойчивы, в то время как дibenзиловый эфир АТФ расщепляется.



Интересно, что при фосфорилировании незащищенных нуклеотидов, моноэтерифицированными фосфоамидатами, реакция идет ступенчато, и АТФ (VII) не получается непосредственно из АМФ (XXV). Для выяснения возможности использования фосфоамидатного метода в синтезах природных нуклеотидных коферментов исследовалась реакция между АМФ и избытком фосфоамидата в диэтилформамиде⁷⁶. Ионообменная хроматография показала присутствие в полученном продукте следующих соединений: АМФ — 34%, АДФ — 27%, АТФ — 21%, и высших нуклеотидполифосфатов 18%. Из этого следует, что фосфоамидатным методом можно создать пирамидную связь, но он так же как и карбодиимидный метод не обладает строгой специфичностью.

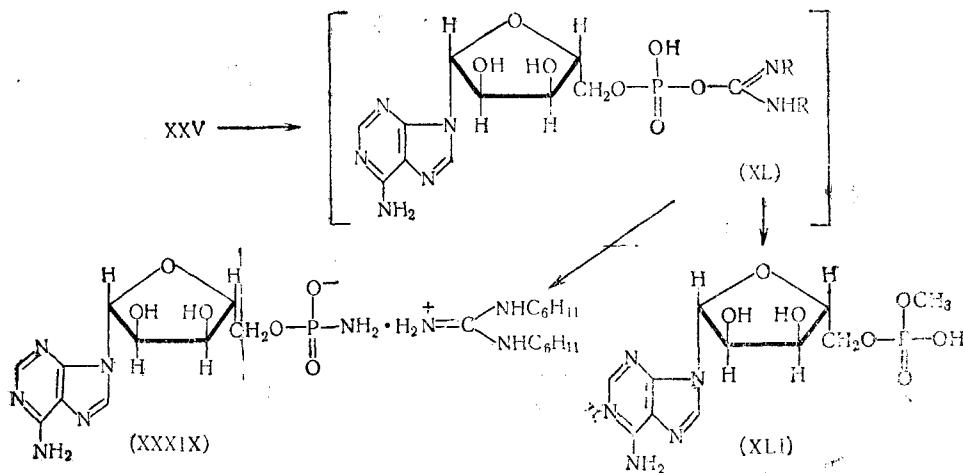


Был предложен другой вариант фосфоамидатного метода, заключающийся в использовании фосфоамидатного производного нуклеотида вместо амида фосфорной кислоты. Таким образом из 2',3'-ди-*O*-ацетиладенозина (XXXVI) и фенилфосфодихлоридата (XXXVII) в присутствии хинолина был синтезирован 2',3'-ди-*O*-ацетиладенозин-5'-фенилфосфохлоридат (XXXVIII), обработкой которого сухим аммиаком в диоксане и затем гидратом окиси лития были удалены ацетильная и фенильная группы, и получен аденоzin-5'-фосфоамидат (XXXIX), с выходом 25%⁷⁶



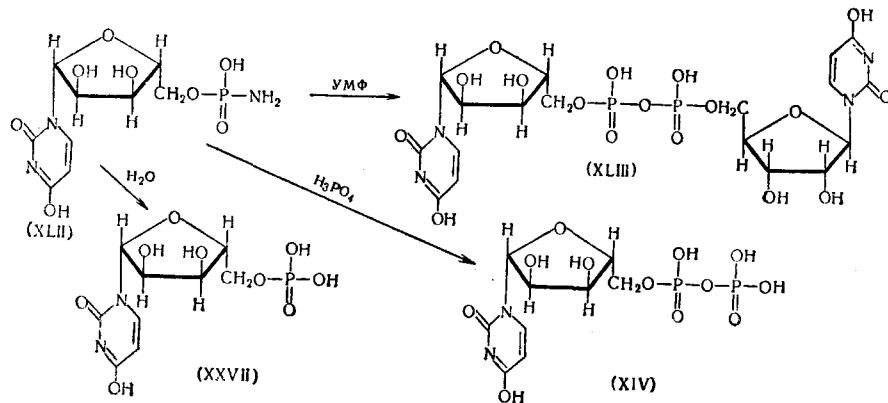
При действии на соединение XXXIX пятикратным избытком 85%-ной ортофосфорной кислоты в *o*-хлорфеноле при 0° получен АДФ (III) с выходом 50%; в этом процессе не наблюдалось побочных реакций, за исключением может быть некоторого гидролиза аденоzin-5'-фосфоамидата в АМФ. Однако такой многостадийный путь синтеза фосфоамидатов мало применим для препаративных целей.

Более простой и удобный метод получения нуклеозид-5'-фосфоамидатов из нуклеотидов и избытка ДЦК в присутствии аммиака предложил Хорана⁷⁷. Оказалось, что при получении аденоzin-5'-фосфоамидата из АМФ (XXV) действием избытка ДЦК обработку аммиаком лучше всего вести в трет.-бутаноле и формамиде при 80° в течение 3 часов⁷⁸. Этим методом аденоzin-5'-фосфоамидат (XXXIX) выделен в виде кристаллической дициклогексилгуанидиновой соли с выходом 85—92%



При проведении реакции в водном пиридине основным продуктом был исходный АМФ. Трудно допустить, что АМФ получается в результате гидролиза аденоzin-5'-фосфоамидата в водном пиридине, так как известно, что фосфоамидаты устойчивы в основных и нейтральных средах. Вероятнее всего это можно объяснить лабильностью предполагаемого промежуточного соединения (XL) в этой среде. Метиловый спирт также оказался неподходящим растворителем, так как при этом вместо ожидаемого фосфоамидата образовался метиловый эфир АМФ (XLI).

Аналогичным образом получалась и кристаллическая дициклогексилгуанидиновая соль уридин-5'-фосфоамидата (XLII)⁷⁹ с выходом 75%, из которой действием 85%-ной ортофосфорной кислотой синтезирован УДФ (XIV) с выходом 50%. Присутствие в продукте реакции УМФ (XXVII) можно объяснить возможным гидролизом уридин-5'-фосфоамидата в кислой среде, а наличие следов симметричного Р¹,Р²-диуридин-5'-пироfosфата (XLIII) — взаимодействием УМФ с уридин-5'-фосфоамидатом. Для разделения веществ, содержащихся в реакционной смеси, удачным оказалось их осаждение на ионообменной смоле Даэкс-1 (в хлоридной форме) с последующим элюированием раствором хлористого лития.



Фосфоамидатный метод образования пирамофосфатной связи был распространен на синтез цитидин-5'-дифосфата (ЦДФ) и гуанозин-5'-дифосфата (ГДФ)³⁰. Цитидин-5'-фосфоамидат получался обычным путем, однако при получении фосфоамидного производного гуанозин-5'-дифосфата встретились трудности, особенно при его выделении, так как вещество разлагалось при комнатной температуре на гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ) и аммиак.

ГДФ был получен из аммониевой соли ГМФ и 85%-ной ортофосфорной кислоты при 0° в *o*-хлорфеноле; кроме ГДФ (58%) в продукте реакции обнаружен ГМФ (34%) и Р¹,Р²-дицитидин-5'-пирамофосфат (~1%)⁸⁰.

Подобные же результаты были получены при взаимодействии дициклогексилгуанидиновой соли цитидин-5'-фосфоамидата с 85%-ной ортофосфорной кислотой в *o*-хлорфеноле⁸⁰, получено: ЦДФ 50%, цитидин-5'-дифосфата 31%, Р¹,Р²-дицитидин-5'-пирамофосфата 3%.

Если реакцию фосфорилирования проводить с безводной ортофосфорной кислотой в растворе диоксана, то выход дифосфата можно довести до 83%⁸⁰.

При конденсации 1,3-дициклогексилгуанидиновой соли аденоzin-5'-фосфоамидата (XXXIX) с бис-триэтиламмониевой солью пирамофосфорной кислоты в смеси трикрезола и ацетонитрила получается смесь продуктов, содержащая 78% АТФ, 10% АДФ и 12% АМФ (в молярных соотношениях). После очистки на смоле Амберлит CG-400 (в хлоридной

форме) АТФ был выделен в виде бариевой соли с общим выходом 43%⁸¹. Аналогично были получены 5'-трифосфаты уридуна, цитидина и дезоксиаденозина⁸¹.

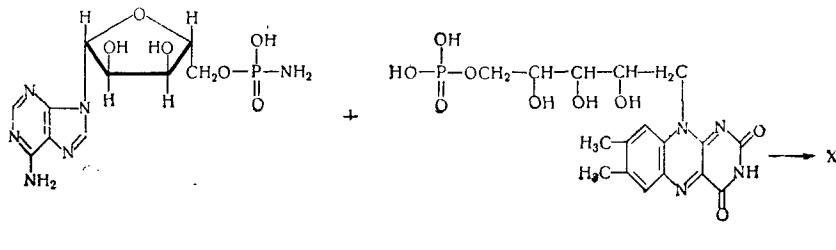
Взаимодействием дициклогексилгуанидиновых солей аденоzin-5'- и уридин-5'-фосфоамидатов с фенилфосфатом в безводном пиридине были получены Р¹-аденоzin-5'-Р²-фениллирофосфат и Р¹-уридин-5'-Р²-фениллирофосфат с выходами 70 и 87%, соответственно⁷⁷.

Применение производных нуклеозидфосфоамидатов (морфолидатов, имидазолидатов) для синтеза ди- и трифосфатов описано ниже.

Рассмотренный выше метод синтеза АДФ (III)⁷⁵ из аденоzin-5'-фосфоамида и избытка ортоfosфорной кислоты Моффат и Хорана использовали для получения сложных нуклеотидных коферментов, таких как УДФГ и ФАД.

2. Флавинадениндинуклеотид

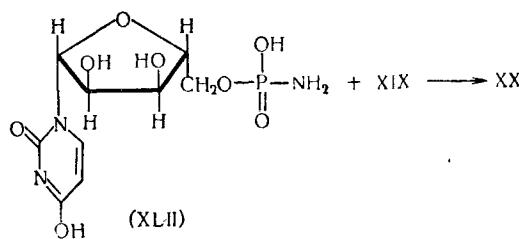
Важной задачей в синтезе ФАД (Х) фосфоамидным методом была необходимость найти такую систему растворителей, которая одинаково хорошо растворяла бы и рибофлавин-5'-fosфат (ХVIII) и аденоzin-5'-фосфоамидат (ХХХІХ). Безводный пиридин непригоден для этой цели, однако его смесь с *o*-хлорфенолом оказалась удачной. Конденсацию проводили в смеси этих растворителей в присутствии 2,5-молярного избытка пиридиновой соли ФМН при комнатной температуре в течение 4 дней⁸².



(xxxix) (xxviii)
Для разделения продуктов реакции успешно была использована диэтиламиноэтилцеллюзная колонка (в хлоридной форме)⁸², на которой ФАД был выделен в виде лигниевой соли с выходом 40% и содержанием 90%.

3 Уридинифосфатглюкоза

В синтезе УДФГ (ХХ) ⁸² исходили из дициклогексилгуанидиновой соли уридин-5'-фосфоамидата (XLII) и три-*n*-октиламмониевой соли *a*-D-глюкозо-1-фосфата (XIX). Так как эти соли хорошо растворимы в безводном пиридине, то реакцию можно было вести в гомогенной среде, применяя четырехкратный избыток фосфата сахара:



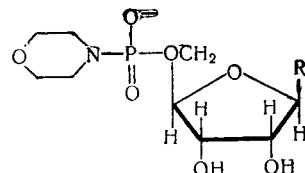
В реакционной смеси помимо УДФГ присутствовали УМФ и небольшие количества симметричного Р¹,Р²-диуридин-5'-пироfosфата. Для выделения кофермента очень удачным оказалось применение анионооб-

менной смолы Дауэкс-2 в хлоридной форме. Выход УДФГ (в виде аморфной литиевой соли) составлял 59%; вещество оказалось достаточно чистым.

Уридин-5'-фосфоамидат устойчив в водном пиридине и такую среду можно было бы применять в реакции. Однако оказалось, что увеличение количества воды приводит к снижению выхода УДФГ, при этом одновременно увеличивалось содержание уридин-5'-фосфата и образовывались небольшие количества Р¹,Р²-диуридин-5'-фосфата. Возможно, что фосфатные анионы катализируют гидролиз фосфоамидата и появление симметричного Р¹,Р²-диуридин-5'-фосфоамидата можно объяснить взаимодействием уридин-5'-фосфата и уридин-5'-фосфоамидата. Поэтому для получения несимметричных пирофосфатов лучше использовать безводную среду во избежание образования нежелательных побочных продуктов.

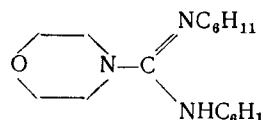
Однако фосфоамидатный метод, обладая известными преимуществами перед ранее описанными методами, не является достаточно общим и удовлетворительным методом синтеза нуклеотидных коферментов. Поэтому дальнейшие работы были направлены на исследование реакционноспособных замещенных нуклеозидфосфоамидатов, производных от различных ароматических аминов и азотистых гетероциклов. Были получены и изучены нуклеозидфосфопиperiидаты, нуклеозидфосфоанизидаты и нуклеозидфосфоморфолидаты⁸³. Оказалось, что с сильными основаниями, например с пиридином, реакция идет лишь на 20%, в то время как со слабым основанием (*p*-анизидином и морфолином) реакция протекает почти с количественным выходом. В отношении реакционной способности нуклеозидфосфопиperiидаты оказались более активными, чем нуклеозидфосфоанизидаты. Нуклеозидфосфоморфолидаты по своей активности занимают промежуточное положение. В последующих синтезах нуклеогидов и нуклеотидных коферментов использовались нуклеозидфосфоморфолидаты благодаря их достаточно высокой активности и легкости получения.

Нуклеозидфосфоморфолидаты получаются в виде кристаллических 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксиамидиневых солей при медленном приливании раствора ДЦК в трет.-бутиловом кипящем растворе нуклеозид-5'-фосфата и морфолина в водном трет.-бутиловом



где R = аденин, уридин, цитидин, гуанидин.

Образование нуклеозидфосфоморфолидатов сопровождается побочной реакцией взаимодействия морфолина с ДЦК в гуанидины такого типа:



Чем сильнее основание, тем быстрее увеличивается скорость образования такого соединения.

Возможность использования замещенных нуклеозидфосфоамидатов в создании пирофосфатной связи была исследована на модельном синтезе Р¹-аденозин-5', Р²-фенилпирофосфата, который в случае фосфоанизидата получался с 90%-ным выходом, правда, в течение длительного

времени. Наиболее реакционноспособным был фосфопиперидат, но его применение ограничено трудностью его приготовления⁸³.

Фосфоамидатный метод, использующий нуклеозидфосфоролидатные производные, был распространен далее на получение сложных нуклеотидных коферментов.

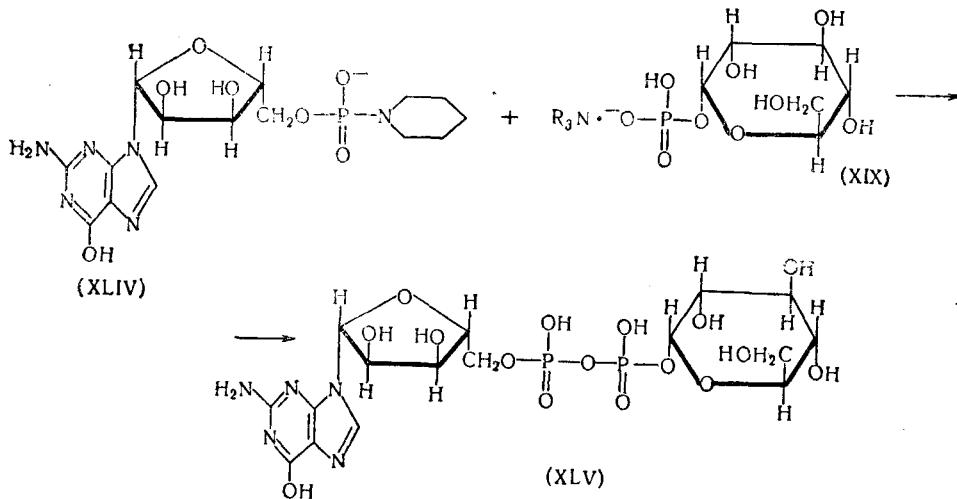
УДФГ (XX) была получена конденсацией 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксиамидиневой соли уридин-5'-фосфоролидата с трехкратным молярным эквивалентом три-*n*-октиламмониевой соли *a*-D-глюкозо-1-фосфата (XIX) в безводном пиридине при комнатной температуре в течение трех дней^{84, 85}. Продукт реакции хроматографировался на ионообменной смоле Дауэкс-1 (в хлоридной форме), и УДФГ была выделена в виде литиевой соли с выходом 70 %. Фосфоамидатным методом УДФГ получается с лучшим выходом и гораздо более коротким путем, чем другими методами.

Аналогичным образом были получены уридинифосфатгалактоза, цитидинифосфатглицерин, гуанозинидифосфатманноза с общим выходом 63—70 %⁸⁴. Этот же метод был использован для получения нуклеозиддифосфатов. Конденсацию нуклеозид-5'-фосфоролидатов с триалкиламмониевыми солями ортофосфорной кислоты проводят в безводном пиридине при комнатной температуре в течение 2—3 дней. Цитидин-5'-дифосфат и уридин-5'-дифосфат получены с выходом 78 и 67 % соответственно⁸³.

Взаимодействием аденоzin-5'-фосфоролидата с бис-три-*n*-бутиламмониевой солью неорганического пирофосфата в безводном пиридине в течение 5 часов удалось получить АТФ с общим выходом 43 %⁸³. Интересно отметить, что в начале реакции сразу образуется значительное количество АТФ, концентрация которого затем быстро уменьшается, вероятнее всего благодаря влиянию избытка неорганического пирофосфата, присутствующего в реакционной массе.

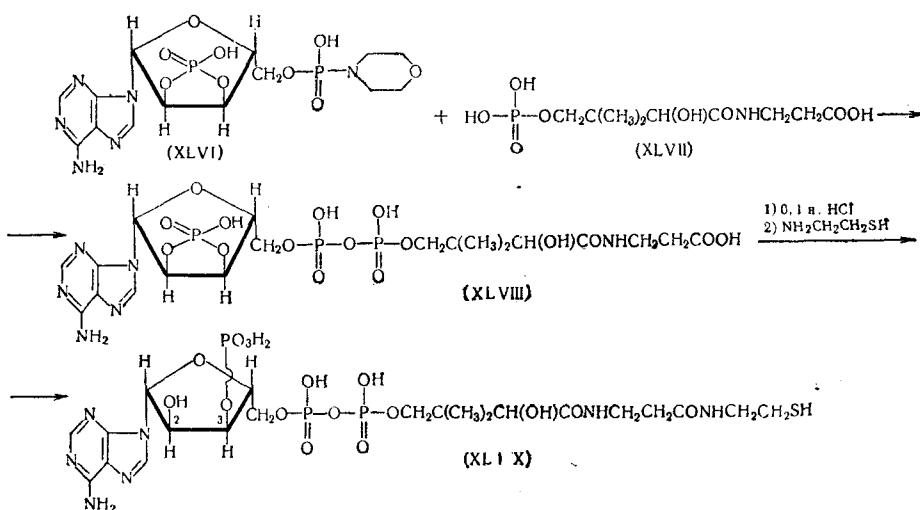
4. Гуанозинидифосфатглюкоза

Фосфоамидатный метод был использован в синтезе гуанозинидифосфатглюкозы (XLV) (выделяемой из *Eremothecium ashbyii*). В качестве исходного продукта был взят гуанозин-5'-N-циклогексилфосфоамид (XLIV). Гуанозин-5'-фосфоамид и гуанозин-5'-фосфоролидат оказались неактивными вследствие их малой растворимости в пиридине⁸⁶. Соединение XLIV вводили в конденсацию с три-*n*-октиламмониевой солью *a*-D-глюкопиранозо-1-фосфатом (XIX) в безводном пиридине. Синтетический продукт очищен ионообменной хроматографией на Дауэкс-1 в хлоридной форме и выделен в виде литиевой соли:



5. Кофермент А

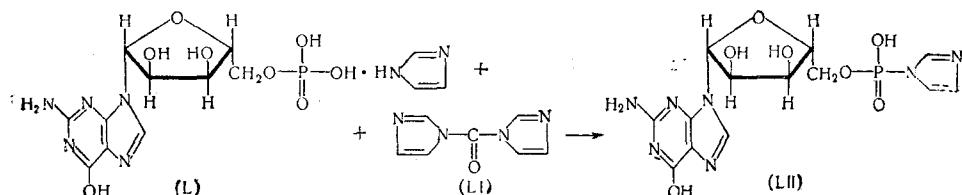
В основу синтеза КоА (XLIX) Моффат и Хорана^{87, 88} положили принцип фосфоамидного метода, применив для синтеза фосфоморфолидное производное. Первоначально из аденоzin-2'-(3'),5'-дифосфата и морфолина в присутствии дициклогексилкарбодиимида был получен аденоzin-2'-(3'),5'-дифосфоморфолидат (XLVI) с выходом 98%. Затем соединение XLVI конденсировалось с 4'-фосфатом *DL*-пантотеновой кислоты (XLVII) в безводном пиридине при комнатной температуре. Продукт конденсации XLVIII после выделения и очистки методом ионообменной хроматографии был обработан 0,1 N соляной кислотой для раскрытия циклической фосфатной связи, после чего он вводился в реакцию с 2-меркаптоэтиламином.



Хроматографией на адсорбционной колонке была выделена смесь КоА и изо-кофермента А (2'-фосфорный изомер) с общим выходом 50%, которая обладала лишь 33% биологической активности природного кофермента А, так как изомерная форма почти не активна.

Конденсация соединения XLVI проведена и с *D*-пантетенин-4'-фосфатом, при этом также получались изомерные формы — КоА и изо-КоА⁸⁷; из них большей ферментативной активностью (86%) обладал образец синтетического кофермента А, меньшей (4%) — изо-кофермент.

В продолжение изучения возможности использования нуклеозидфосфоамидов, производных от различных ароматических аминов и азотистых гетероциклов, для создания лирофосфатной связи был получен аденоzin-5'-фосфоимидазолидат (АМФ-И) (LI) и исследованы его реакции с нуклеофильными реагентами^{89–92}. Имидазолиевая соль АМФ-И легко получается при действии 1,1-карбонилдиimidазола (LI) на имидазолиевую соль аденоzinмонофосфата (L) в среде безводного диметилформамида, а также при взаимодействии 1 моля АМФ с 2–4 молями 1,1-карбонилдиimidазолом с почти количественным выходом:



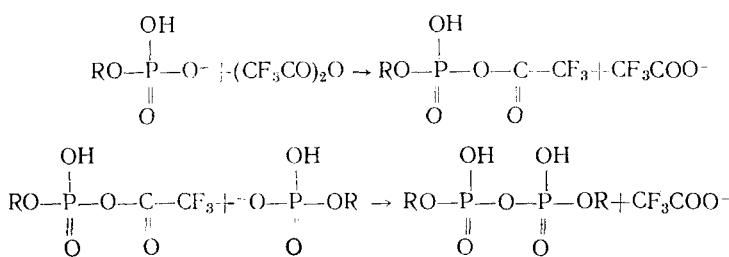
Из имидазолиевой соли АМФ-И и АМФ был получен Р¹,Р²-диаденоzin-5'-пирофосфат, который был выделен хроматографией на смоле Дауэкс-1 (формиатная форма) с выходом 57% в кристаллическом виде. При конденсации АМФ-И с уридин-5'-фосфатом образуется Р¹-(аденоzin-5')-Р²-(уридин-5')-пирофосфат.

Взаимодействием имидазолиевой соли АМФ-И с избытком 85%-ной Н₃РО₄ при —10, —20° получается АДФ с 25%-ным выходом. Обработка имидазолиевой соли АМФ-И водным аммиаком в среде диметилформамида и трет.-бутанола приводит к расщеплению соединения LII и к образованию аденоzin-5'-фосфоамида⁸⁹.

Фосфоамидный метод образования пирофосфатной связи совершение и проще других методов, так как: во-первых, конденсация двух нуклеотидных молекул проводится без предварительной защиты гидроксильных групп, что намного сокращает и упрощает схему синтеза; хотя карбодиimidный метод также не требует предварительной защиты гидроксильных групп, но в результате конденсации часто образуется сложная смесь веществ, что затрудняет выделение синтезируемого кофермента; во-вторых, ценность метода заключается в возможности использования водной среды, что очень важно в тех случаях, когда присутствие уже небольшого количества воды увеличивает растворимость реагирующих компонентов. Следует также отметить, что этим методом нуклеотидные коферменты можно получать с более высокими выходами.

Помимо рассмотренных выше трех важнейших методов образования пирофосфатной связи нуклеотидных коферментов применялись и другие методы, использующие различные конденсирующие агенты.

Для синтеза ФАД из ФМН (в виде натриевой соли) и АМФ в качестве конденсирующего средства был применен трифторуксусный ангидрид⁹⁴. Предварительные работы в этом направлении выполнены Шустером с сотрудниками⁹⁵. Реакция протекает путем атаки трифторуксусного ангидрида фосфатным анионом с образованием промежуточного ангидрида, который, взаимодействуя со вторым фосфатным анионом, образует Р¹,Р²-динуклеозид-5'-пирофосфат:



Хотя этим методом можно получать значительные количества ФАД, тем не менее выход вещества не высокий (~10%); выделение и очистку ФАД производили хроматографией на порошке целлюлозы³⁵.

Подобным методом из аденоzin-5'-фосфата и никотинамидмонуклеотида в присутствии трифторуксусного ангидрида был получен никотинамидаденидинуклеотид с низким выходом⁹⁵.

Интересно, что конденсация в присутствии уксусного ангидрида⁹⁶ приводит исключительно к симметричным соединениям. Этим методом был получен Р¹,Р²-дитимидин-5'-пирофосфат из 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата обработкой его 0,275 ммол уксусного ангидрида с выходом ~55%; было показано, что двадцатимолярный избыток уксусного ангидрида приводит к полному расщеплению пирофосфатной связи.

Применение смеси хлорокиси фосфора и фосфорного ангидрида для конденсации двух соответствующих незащищенных мононуклеотидов дает возможность получить ФАД⁹⁷. Реакцию проводили в феноле, в котором хорошо растворяются реагирующие вещества^{98, 99}. В этом синте-

зе, помимо ФМН и АМФ применялись рибофлавин-5'-дифосфат и аденоzin, рибофлавин и АДФ, а также другие исходные вещества.

При использовании в качестве конденсирующего средства хлорокиси фосфора из 2':3'-О-изопропилиденаденоzина получен 2':3'-О-изопропилиденаденоzин-5'-трифосфат с выходом 45% и содержанием 60—65%¹⁰⁰.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Baddiley, V. Clark, J. Michalski, A. Todd, J. Chem. Soc., **1949**, 815.
2. J. Baddiley, A. Todd, Там же, **1947**, 648.
3. J. Baddiley, A. Michelson, A. Todd, Там же, **1949**, 582.
4. A. Michelson, A. Todd, Там же, **1949**, 2487.
5. A. Michelson, Chem. a. Ind., **1957**, 1669.
6. A. Michelson, J. Chem. Soc., **1958**, 1957.
7. A. Michelson, Chem. a. Ind., **1960**, 1267.
8. S. Christie, D. Elmore, G. Kennep, A. Todd, F. Weymouth, J. Chem. Soc., **1953**, 2947.
9. Jachimavicz, Biochem. Ztschr., **292**, 356 (1937).
10. J. Gulland, E. Holiday, J. Chem. Soc., **1940**, 746.
11. P. Levene, R. Tipson, J. Biol. Chem., **121**, 131 (1937).
12. H. Bredereck, E. Berger, J. Ehrenberg, Ber., **73**, 269 (1940).
13. F. Cramer, G. Weimann, Chem. a. Ind., **1960**, 46.
14. H. Grunze, W. Korsansky, Angew. Chem., **71**, 407 (1959).
15. R. Kuhn, H. Rudy, F. Weygand, Ber., **69**, 1549 (1936).
16. R. Kuhn, H. Rudy, Ber., **68**, 383 (1935).
17. H. Forrest, A. Todd, J. Chem. Soc., **1950**, 3295.
18. Англ. пат. 694470; C. A., **48**, 10787 (1954).
19. Ам. пат. 2610176; C. A., **47**, 87826 (1953).
20. L. Flexser, W. Farkas, Ам. пат. 2610177; C. A., **47**, 8781 (1953).
21. M. Viscontini, C. Ebner, Helv. Chem. Acta., **35**, 457 (1952).
22. Австр. пат. 157818; РЖХим., **1956**, 17358.
23. L. Flexser, W. Farkas, Ам. пат. 2610178; C. A., **47**, 8781 (1953).
24. Англ. пат. 630463; J. Appl. Chem., **4**, 643 (1954); РЖХим., **1956**, 55932.
25. Tetsko Sato, Juju Joshimura, Tsuneo Takao, Proc. Japan Acad., **29**, 26 (1953); C. A., **49**, 1063 (1955).
26. Tetsko Sato, Toshitsugu Joshimura, C. A., **52**, 3875 (1958).
27. H. Forrest, H. Mason, A. Todd, J. Chem. Soc., **1952**, 2530.
28. S. Christie, G. Kennep, A. Todd, Nature, **170**, 924 (1952).
29. S. Christie, G. Kennep, A. Todd, J. Chem. Soc., **1954**, 46.
30. E. Dimant, D. Sanadi, F. Heunnekens, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5440 (1952).
31. F. Heunnekens, G. Kilgour, Там же, **77**, 6716 (1955).
32. N. Siliprandi, P. Bianchi, Biochem. et. biophys. acta, **16**, 424 (1955).
33. N. Siliprandi, P. Cerletti, Arch. Biochem. biophys., **76**, 214 (1958).
34. L. Whitby, Biochem. et. biophys. acta, **15**, 148 (1954).
35. L. Whitby, Biochem. J., **54**, 437 (1953).
36. P. Cerletti, N. Siliprandi, Acta Vitaminol., **9**, 145 (1955).
37. G. Kilgour, S. Felton, F. Heunnekens, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2254 (1957).
38. K. Giri, P. Krishnaswamy, J. Indian Inst. Sci., **38A**, 232 (1956); C. A., **50**, 721 (1954); **51**, 5880 (1957).
39. N. Anand, V. Clark, R. Hall, A. Todd, J. Chem. Soc., **1952**, 3665.
40. V. Clark, A. Todd, Там же, **1950**, 2030.
41. G. Kenner, A. Todd, F. Weymouth, Там же, **1952**, 3675.
42. G. Kenner, A. Todd, R. Webb, F. Weymouth, Там же, **1954**, 2288.
43. A. Kornberg, Symp. Phosphorus Metabolism, **1**, 392 (1951).
44. A. Michelson, A. Todd, J. Chem. Soc., **1956**, 3459.
45. A. Todd, Science, **127**, 787 (1958).
46. W. Corby, G. Kennep, A. Todd, J. Chem. Soc., **1952**, 1234.
47. H. Khorana, A. Todd, Там же, **1953**, 2257.
48. F. Cramer, Angew. Chem., **72**, 236 (1960).
49. M. Smith, J. Moffatt, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **80**, 6204 (1958).
50. H. Khorana, Chem. Revs., **53**, 145 (1953).
51. A. Todd, Chem. a. Ind., **1958**, 170.
52. A. Todd, Gazz. chim. ital., **89**, 126 (1954).
53. H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3517 (1954).
54. Le Page, H. Carter, Biochemical Preparations, New York, 1949, vol. I, стр. 165.
55. R. Hall, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **76**, 5056 (1954).
56. C. Kilgour, F. Heunnekens, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2256 (1957).
57. M. Smith, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1141 (1958).
58. G. Kenner, A. Todd, R. Webb, J. Chem. Soc., **1954**, 2843.
59. F. Heunnekens, S. Felton, Methodes in Enzymology, v. III, ed. by E. Colowick, N. Kaplan, Academic Press, New York, 1957.

60. C. Dekker и другие, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3522 (1954).
 61. G. Tener, H. Khorana, Там же, **77**, 5349 (1955).
 62. A. Hughes, G. Kenner, A. Todd, J. Chem. Soc., **1957**, 3733.
 63. E. Kennedy, J. Biol. Chem., **222**, 185 (1956).
 64. J. Baddiley, J. Buchanan, A. Sanderson, J. Chem. Soc., **1958**, 3107.
 65. J. Baddiley, J. Buchanan, G. Fawcett, Там же, **1959**, 2192.
 66. B. Chase, G. Kenner, A. Todd, Там же, **1956**, 1371.
 67. G. Kenner, A. Todd, R. Webb, Там же, **1956**, 1231.
 68. F. Atherton, A. Morrison, R. Gremlyn, G. Kenner, A. Todd, R. Webb, Chem. a. Ind., **1955**, 1183.
 69. F. Cramer, M. Winter, Ber., **92**, 2761 (1959).
 70. G. Kenner, C. Reese, A. Todd, J. Chem. Soc., **1958**, 546.
 71. M. Jones, L. Spector, F. Lipmann, J. Am. Chem. Soc., **77**, 819 (1955).
 72. L. Hall, R. Metzenberg, P. Cohen, J. Biol. Chem. **230**, 1013 (1958).
 73. R. Gremlyn, G. Kenner, A. Todd, J. Chem. Soc., **1960**, 4511.
 74. V. Clark, G. Kirby, A. Todd, Там же, **1957**, 1497.
 75. E. Hobbs, L. Corbridge, B. Raistrick, Acta Cryst., **6**, 621 (1953).
 76. R. Chambers, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **80**, 3749 (1958).
 77. H. Khorana, Там же, **79**, 4240 (1957).
 78. R. Chambers, J. Moffatt, Там же, **79**, 3752 (1958).
 79. R. Chambers, Там же, **79**, 3032 (1959).
 80. R. Chambers, P. Shapiro, V. Kurkov, Там же, **82**, 970 (1960).
 81. Kuniyoshi Tanaka, Mikio Honjo, Jasushi Sanno, Hiroki Moriyama, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **8**, 749 (1960); C. A., **55**, 15500 (1961).
 82. J. Moffatt, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3755 (1958).
 83. J. Moffatt, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **83**, 649 (1961).
 84. S. Rosemann, J. Distler, J. Moffatt, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **83**, 659 (1961).
 85. J. Moffatt, Biochem. Preparations, **8**, 125 (1961); C. A., **55**, 18748 (1961).
 86. J. Baddiley, N. Hughes, A. James, J. Chem. Soc., **1961**, 2574.
 87. J. Moffatt, H. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1265 (1959).
 88. J. Moffatt, H. Khorana, Там же, **83**, 663 (1961).
 89. L. Goldman, J. Marsico, G. Anderson, J. Am. Chem. Soc., **82**, 2969 (1960); РЖХим., **1961**, 5Ж389.
 90. L. Goldman, J. Marsico, G. Anderson, Ам. пат. 2951838; C. A., **55**, 4536 (1961).
 91. F. Cramer, H. Schaller, H. Staab, Ber., **94**, 1612 (1961).
 92. H. Schaller, H. Staab, F. Cramer, Ber., **94**, 1621 (1961).
 93. F. Cramer, H. Schaller, Ber., **94**, 1634 (1961).
 94. Chester De Luca, N. Kaplan, J. Biol. Chem., **223**, 569 (1956).
 95. L. Shuster, N. Kaplan, F. Stolzenbach, Там же, **215**, 195 (1955).
 96. H. Khorana, J. Viessolvi, J. Am. Chem. Soc., **81**, 4660 (1956).
 97. Kenzo Suzuki, Hirofumi Ito, Яп. пат. 8971 (1958); C. A., **54**, 5716 (1960).
 98. Katashi Makino, Toshio Kuroda, Kunitake Ohike, Hirosuke Kobayashi, Jikeikai Med., J., **6**, 58 (1959); C. A., **55**, 11426 (1961).
 99. Яп. пат. 2226 (1959); РЖХим., **1961**, 17Л386.
 100. Яп. пат., 2320 (1959); C. A., **54**, 13152 (1960).

Всесоюзный н.-и. витаминный ин-т
Лаб. химии коферментов