



УДК 547.963.32.057

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ  
НУКЛЕОЗИД(5')ПОЛИФОСФО(5')НУКЛЕОЗИДОВТуманов Ю. В., Гришаев М. П., Рукавишников М. Ю.,  
Аммосов А. Д.*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

В работе описан химический метод синтеза нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозидов, выполняющих регуляторные, сигнальные функции в живой клетке. Сущность метода заключается в активации нуклеозидфосфата 4-диметиламинопиридином в присутствии реагентов окислительно-восстановительной конденсации —  $\text{Rh}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  и его взаимодействии с другим нуклеозидфосфатом. Простота подхода и возможность варьирования природы нуклеозида позволяют получать различные по длине полифосфатной цепи как симметричные, так и несимметричные, в том числе меченные радиоактивными изотопами (фосфор-32), бис(нуклеозид)полифосфаты с высокими выходами (40 — 75%).

В настоящее время наблюдается большой интерес к нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозидам, соединениям, впервые обнаруженным в клетках млекопитающих [1]. Первым из них был идентифицирован  $\text{A}(5')\text{p}_4(5')\text{A}$  как продукт обратной реакции активации аминокислот [2]. Некоторые аминоксил-тРНК-синтетазы синтезируют такие нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозиды, как  $\text{Ar}_4\text{A}$ ,  $\text{Ar}_3\text{A}$ ,  $\text{Ar}_4\text{C}$ ,  $\text{Ar}_3\text{C}$ ,  $\text{Ar}_4\text{G}$  в процессе взаимодействия связанного с ферментом аминоксиладенилата с соответствующим нуклеотидом [2, 3]. Было замечено, что уровень  $\text{Ar}_4\text{A}$  меняется в широких пределах в зависимости от скорости пролиферации клеток [4]. В работах [5] показано, что добавление  $\text{A}(5')\text{p}_4(5')\text{A}$  к проницаемой покоящейся культуре клеток ВНК-21 стимулирует синтез ДНК. Найдено также, что  $\text{A}(5')\text{p}_4(5')\text{A}$  связывается с частично очищенной ДНК полимеразой  $\alpha$  из клеток HeLa [6]. Таким образом, стало возможным интерпретировать роль  $\text{A}(5')\text{p}_4(5')\text{A}$  как сигнальной регуляторной молекулы, связывающей первый шаг биосинтеза белка с инициацией синтеза ДНК [1].

В работах [7—8] при транскрипции бакуло- и реовирусов были обнаружены нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозиды состава  $\text{A}(5')\text{p}_n(5')\text{N}$ , где  $\text{N}=\text{A}$ ,  $\text{C}$ ,  $\text{G}$ , которые, по мнению авторов, играют роль терминальных праймеров вирусной РНК при ее репликации. В более поздней работе [9] также показано, что  $\text{Ar}_4\text{A}$ ,  $\text{Ar}_3\text{A}$ ,  $\text{Ar}_3\text{G}$ ,  $\text{Ar}_4\text{G}$  служат сигналом окислительного стресса клетки.

Таким образом, потребность в разработке удобных и быстрых методов синтеза нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозидов, включая меченные радиоактивными изотопами, диктуется расширением и углублением работ в области исследования их роли в живой клетке.

Отмеченные выше ферментативные пути получения динуклеозидполифосфатов с использованием аминоксил-тРНК-синтетаз мало пригодны для препаративных синтезов вследствие малой доступности ферментов, а также неуниверсальны в отношении как длины полифосфатной цепи, так и нуклеозидного состава продукта.

---

Использованы следующие сокращения:  $\text{Np}_n\text{N}'$  — нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозиды;  $\text{aha}^8\text{Ar}_4\text{N}$  — 8-(6-аминогексил-1)аминоаденозил(5')тетрафосфо(5')нуклеозиды; DMAP — 4-диметиламинопиридин; DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид;  $(\text{PyS}_2)$  — 2,2'-дипридилдисульфид;  $\text{Rh}_3\text{P}$  — трифенилфосфин;  $\text{ADP}=\text{p}_2\text{A}=\text{5}'\text{-PP-Ado}$ ; DMSO — диметилсульфоксид.

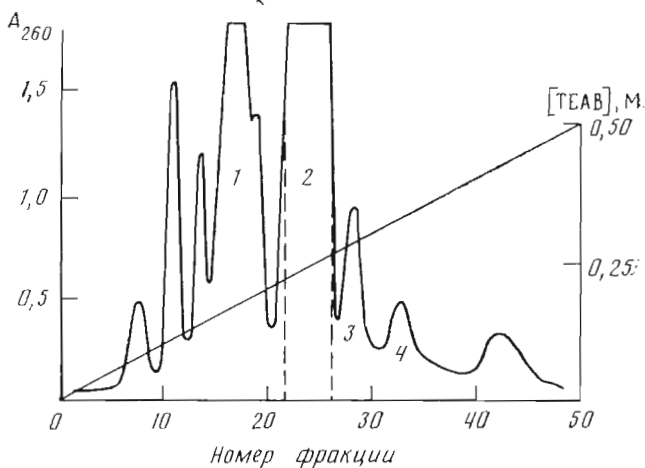


Рис. 1. Выделение  $aha^8Ar_4A$  на PEI-целлюлозе: 1 —  $p_2aha^8A$ ; 2 —  $aha^8Ar_4A$ ; 3 — ADP; 4 —  $Ar_4A$

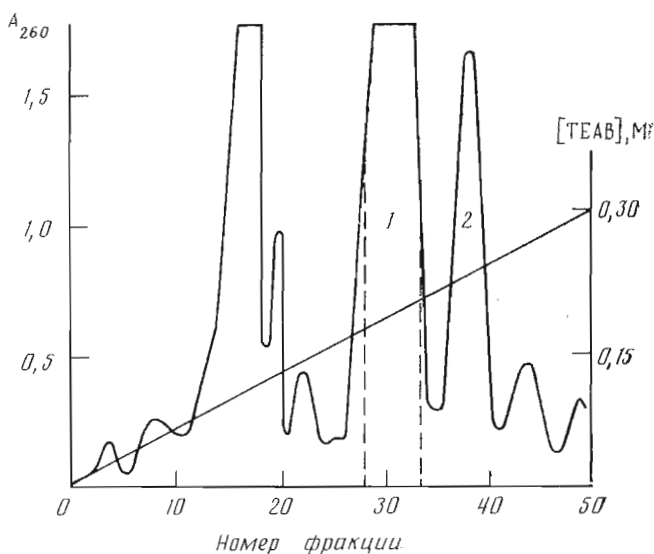


Рис. 2. Выделение  $Ar_3A$  на PEI-целлюлозе: 1 —  $Ar_3A$ ; 2 — ADP

В литературе описаны химические способы получения симметричных динуклеозидполифосфатов обработкой нуклеозидфосфатов DCC [10], реакцией пирофосфата с морфолидами нуклеозидфосфата [11] в безводном пиридине, взаимодействием морфолидата нуклеозидфосфата с другим нуклеозидфосфатом в пиридине [5] с выходами целевого продукта 20–50%. Однако синтез этими способами занимает много времени (2–3 сут) и не всегда позволяет получить несимметричные нуклеозид(5')полифосфо(5') нуклеозиды с различной длиной полифосфатной цепи.

В последнее время достигнуты значительные успехи в активации фосфатной группы нуклеозидфосфатов. Большими возможностями обладает метод активации с применением окислительно-восстановительных реагентов  $Ph_3P/(PyS)_2$  [12]. Авторы показали высокую эффективность этого подхода в синтезе  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ - и  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  нуклеозидтрифосфатов.

Цель настоящего исследования — использование предложенного метода в синтезе соединений другого класса, в частности разработка препаративных методов синтеза динуклеозидполифосфатов различного строения.



Условия синтеза нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозидов

Целевой продукт (IV)	Активируемый фосфонуклеозид (I), мкмоль	ДМАР, мкмоль	Р <sub>h</sub> Р, мкмоль	(PvS) <sub>n</sub> , мкмоль	DMSO/EtOH, 1 : 1, мл	Р-компонент, (III), мкмоль	DMSO*, мл	t, °C	Время, ч	Выход (IV), %
aha <sup>8</sup> Ar <sub>2</sub> A	pрA, 3:3	1200	1200	1200	5	pрaha <sup>8</sup> A, 100	1	45	2	75
aha <sup>8</sup> Ar <sub>2</sub> A	pрA, 60	300	240	240	1,2	pрaha <sup>8</sup> A, 77	0,8	40	2	65
aha <sup>8</sup> Ar <sub>2</sub> G	pрG, 22	410	88	88	0,8	pрaha <sup>8</sup> A, 88	0,5	60	2	65
aha <sup>8</sup> Ar <sub>2</sub> G	pрG, 50	250	200	200	1	pрaha <sup>8</sup> A, 52	0,5	50	2,5	60
dTr <sub>2</sub> A	pT, 8	40	32	32	0,3	pрA, 27	0,2	40	1	53
[β- <sup>32</sup> P]Ar <sub>2</sub> A	pA, 2	40	30	30	0,2	[γ- <sup>32</sup> P]ATP, 2* 0,01	0,05	40	1	63
[β- <sup>32</sup> P]Ar <sub>2</sub> A	pA, 1,5	40	30	30	0,2	[γ- <sup>32</sup> P]ATP, 3* 0,2·10 <sup>-3</sup>	0,05	40	1	70
[β- <sup>32</sup> P]Ar <sub>2</sub> A	pA, 0,61	40	30	30	0,1	[γ- <sup>32</sup> P]ATP, 4* 5·10 <sup>-3</sup>	0,05	40	1	70
[α- <sup>32</sup> P]Ar <sub>2</sub> A	<sup>32</sup> pA 5*, 0,015	40	30	30	0,2	pрpA, 2	0,1	40	2	41
[β- <sup>32</sup> P]Gp <sub>2</sub> A	pG, 1,5	40	30	30	0,2	[γ- <sup>32</sup> P]ATP, 3* 0,2·10 <sup>-3</sup>	0,05	40	1	70
Ar <sub>2</sub> A	pрpA, 50	250	100	100	2	pA, 10	1	45	2	67
Ar <sub>2</sub> A	pрA, 200	1000	800	800	3	pA, 40	1	45	2	72
Ar <sub>2</sub> A	pA, 110	850	680	680	2	pрA, 90	1	45	1,5	66

\* Объем растворителя для Р-компонента.

\*\* Количество радиоактивности в реакции — 100 мкКи, молярная радиоактивность — 10 Ки/ммоль.

3\* 1 мКи, 5000 Ки/ммоль.

4\* 2,5 мКи, 500 Ки/ммоль.

5\* 3 мКи, 200 Ки/ммоль.

Характеристики синтезированных нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозидов

Нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозид	ТСХ, R <sub>f</sub> на DEI-целлюлозе *		УФ-спектры (в воде)		A <sub>236</sub> /A <sub>260</sub>	A <sub>256</sub> /A <sub>260</sub>	P, моль/моль основания
	система А	система В	λ <sub>max</sub>	λ <sub>min</sub>			
			нм				
aha <sup>8</sup> Ap <sub>4</sub> A	0,43	1,2 <sup>б</sup>	267	237	0,84	0,55	1,82
aha <sup>8</sup> Ap <sub>4</sub> G	0,4 1,4 <sup>а</sup>	1,13 <sup>б</sup>	257, 273 (плечо)	233, 268 (плечо)	0,89	0,55	2,15
Ap <sub>4</sub> A	—	1,3 <sup>а</sup>	260	228	0,18	0,1	2,11
Ap <sub>3</sub> A	—	0,29	260	230	0,2	0,09	1,39
Ap <sub>3</sub> T	0,56	0,3	262	232	0,44	0,15	1,43
Ap <sub>4</sub> G	—	0,88 <sup>а</sup>	259	232	0,5	0,2	1,87
pA	0,63	0,5					
ppA	—	0,21					
pppA	0,28	0,12					

\* Подвижности относительно ATP (а), ADP (б) и GDP (в).

Бис(нуклеозид) полифосфаты не гидролизуются щелочной фосфатазой.

Синтезированные нами <sup>32</sup>P-меченые нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозиды имеют такие же хроматографические и ферментативные характеристики, как и немеченые соединения. Количественное определение соотношения фосфор — основание было проведено методом радиоизотопного определения пикомольных количеств фосфора в форме фосфата в соответствии с методикой [15] (табл. 2).

Нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозиды, несущие первичную аминогруппу, дают положительную реакцию с нингидрином.

Все синтезированные нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозиды устойчивы в нейтральных водных растворах при 4°С в течение нескольких месяцев. Выделенные в твердом виде, они могут храниться при 4°С несколько лет.

Конъюгаты aha<sup>8</sup>Ap<sub>4</sub>N с бычьим сывороточным альбумином были использованы нами позднее для получения иммунных сывороток против соответствующих нуклеотидов, а <sup>32</sup>P-меченые и перадиоактивные бис(нуклеозид) полифосфаты применялись в радиоиммунологическом анализе соответствующих нуклеотидов [16].

Таким образом, предложенный метод синтеза с использованием конденсирующих окислительно-восстановительных реагентов Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub> и гетероциклического амина позволяет достаточно быстро и с хорошим выходом получать нуклеозид(5') полифосфо(5') нуклеозиды различного строения, представляющие значительный интерес в исследованиях по молекулярной биологии и биохимии.

### Экспериментальная часть

В работе использованы нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфаты (Sigma, США), 2,2'-дипиридилдисульфид (Fluka, Швейцария), трифенилфосфин (Chemapol, ЧССР), PEI-целлюлоза (Merck, ФРГ), диметиламинопиридин (Merck, ФРГ), щелочная фосфатаза из *E. coli* (KF 3.1.3.1) и фосфодиэстераза змеиного яда (KF 3.1.4.1; Sigma, США).

Ацетонитрил марки ч. и диметилсульфоксид марки ч. перегоняли над CaH<sub>2</sub>. Ap<sub>4</sub>A получали из ADP с помощью ДСС по методике [10]. Системы для ТСХ: на PEI-целлюлозе — 1 М LiCl (А) или 0,5 М К-фосфат, рН 4,5 (Б); на силуфоле — Pr<sup>o</sup>OH — Et<sub>3</sub>U — H<sub>2</sub>O, 7 : 1 : 2 (В) и Pr<sup>o</sup>OH — NH<sub>4</sub>OH — H<sub>2</sub>O, 7 : 1 : 2 (Г). УФ-спектры получены на спектрофотометрах Perkin — Elmer 550 (США) и ХЖ-1305 (СКБ АП, Ленинград).

aha<sup>8</sup>Ap<sub>4</sub>A. 0,06 ммоль триэтиламониевой соли ADP высушивали упариванием с безводным ацетонитрилом (3×1 мл), растворяли в 1,2 мл смеси диметилсульфоксид — этанол (1:1 по объему) и добавляли

0,3 ммоль DMAP, 0,24 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$  и 0,24 ммоль  $(\text{PyS})_2$ . Смесь выдерживали 20 мин при 20°С. Образование DMAP-производного ADP контролировали ТСХ на Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, предварительно разбавляя аликвоту реакционной смеси 10% раствором пиперидина в этаноле и анализируя получающийся устойчивый  $\beta$ -пиперидид-ADP ( $R_f$  0,3 в системе В).

Отдельно высушивали 0,077 ммоль триэтиламмониевой соли  $\text{p}_2\text{aha}^8\text{A}$  упариванием с ацетонитрилом (3×1 мл), растворяли в 800 мкл безводного диметилсульфоксида, добавляли к первой смеси, упаривали этанол и инкубировали 2 ч при 40°С. После этого к смеси добавляли 10 мл смеси вода — диметилсульфоксид (1:1) и наносили на колонку (20×300 мм) с PEI-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ -форма), отмытой смесью вода — диметилсульфоксид (1:1), 50 мл воды и проводили элюцию градиентом концентрации 0—0,5 М TEAB (800 мл). Скорость элюции 40 мл/ч, объем фракции 1,5 мл (рис. 1). Выход  $\text{aha}^8\text{Ap}_2\text{A}$  65% (относительно исходного ADP), характеристики приведены в табл. 2.

*Аденозин(5')трифосфо(5')аденозин (A(5')p<sub>3</sub>(5')A)*. 0,17 ммоль триэтиламмониевой соли AMP высушивали упариванием с безводным ацетонитрилом (3×1 мл), растворяли в 2 мл смеси диметилсульфоксид — этанол, добавляли 0,85 ммоль DMAP, 0,68 ммоль  $\text{Ph}_3\text{P}$ , 0,68 ммоль  $(\text{PyS})_2$  и оставляли при комнатной температуре в течение 20 мин. Ход образования DMAP-производного AMP (II) определяли как описано выше. ТСХ проводили на Kieselgel 60 F<sub>254</sub>;  $R_f$  пиперидида AMP 0,62 (система В).

Отдельно высушивали 0,09 ммоль триэтиламмониевой соли 5'-ADP упариванием с ацетонитрилом (3×1 мл), растворяли в 1 мл DMSO, добавляли к первой смеси, упаривали этанол и инкубировали смесь при 45°С в течение 1,5 ч. После этого добавляли 10 мл смеси вода — диметилсульфоксид (1:1 по объему), наносили на колонку с PEI-целлюлозой (20×300 мм). Хроматографию проводили как описано выше; профиль элюции приведен на рис. 2. Выход продукта составил 66% относительно исходного ADP, характеристики приведены в табл. 2.

*P<sup>i</sup>,P<sup>i</sup>-(Бисаденозил-5')[ $\beta$ -<sup>32</sup>P]тетрафосфат ([ $\beta$ -<sup>32</sup>P]Ap<sub>4</sub>A)* 0,61 мкмоль триэтиламмониевой соли AMP высушивали упариванием с ацетонитрилом (2×1 мл), растворяли в 100 мкл смеси диметилсульфоксид — этанол, добавляли 30 мкмоль  $\text{Ph}_3\text{P}$ , 30 мкмоль  $(\text{PyS})_2$ , 40 мкмоль DMAP и оставляли на 20 мин при 20°С. Образование DMAP-производного AMP определяли ТСХ как описано выше.  $R_f$  пиперидида AMP 0,68 (система Г).

Отдельно высушивали 2,5 мКи триэтиламмониевой соли [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (500 Ки/ммоль, 5 ммоль) упариванием с ацетонитрилом (2×1 мл), растворяли в 50 мкл диметилсульфоксида и переносили в первую смесь. После упаривания этанола смесь инкубировали 1 ч при 40°С, затем добавляли 2 мл смеси диметилсульфоксид — вода (1:1 по объему) и наносили на колонку (4×100 мм) с PEI-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ -форма), отмытой смесью диметилсульфоксид — вода (1:1). Колонку промывали 3 мл 50% водного раствора DMSO, затем 3 мл воды. Выделение целевого продукта проводили в градиенте концентрации 0—0,5 М TEAB (30 мл), скорость элюции 20 мл/ч (рис. 3). Профиль элюции приведен на рис. 3. Выход целевого продукта составляет 70% относительно ATP. Удельная активность полученного [ $\beta$ -<sup>32</sup>P]A(5')p<sub>4</sub>(5')A 500 Ки/ммоль, радиохимическая чистота продукта 94% (определена ТСХ на PEI-целлюлозе в системе А).

По аналогичной методике был синтезирован ряд других нуклеозид(5')полифосфо(5')нуклеозидов (табл. 1).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zamecnik P. C. // Anal. Biochem. 1983. V. 134. № 1. P. 1—10.
2. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Ganewey C. M., Randerath K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. № 1. P. 91—98.
3. Randerath K., Ganewey C. M., Stephenson M. L., Zamecnik P. C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. № 2. P. 98—105.
4. Rapoport E., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 11. P. 3984—3988.

5. Grummt F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 1. P. 371-375.
6. Grummt F., Walli G., Jantzen H. M., Hamprecht K., Hubscher U., Kuenzle C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 19. P. 6081-6085.
7. Smith R. E., Furnichi Y. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 1. P. 475-494.
8. Yamagawa M., Furuichi Y., Shatrin A. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 17. P. 6142-6146.
9. Bochner B. R., Lee P. C., Wilson S. W., Cutler C. W., Ames B. N. // Cell. 1984. V. 37. № 2. P. 225-232.
10. Тарусова П. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. И. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 6. С. 838-843.
11. Reiss R., Moffat J. G. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 18. P. 3371-3377.
12. Гришаев М. П., Рукавишников М. Ю., Самуков В. В., Аммосов А. Д., Портянко А. П. // Тезисы I Всесоюзного совещания по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами». М., 1985. С. 56-57.
13. Калашиников В. В., Нечаев Ю. С., Рязанкин П. А., Шубина Т. Н. // Тезисы сообщений Всесоюзной конференции по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов. Вильнюс, 1982. С. 70.
14. Доброправова О. В., Зыков С. А., Мустаев А. А., Невинский Г. А. // Биооргани. химия. 1982. Т. 10. № 2. С. 1349-1357.
15. Хабибуллаев П. К., Абдукаюмов М., Аммосов А. Д., Грачев М. А., Сидоров В. Н., Гришаев М. П., Ларченко В. А., Маслова Р. Н. // Тезисы I Всесоюзного совещания по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами». М., 1985. С. 64-65.
16. Рукавишников М. Ю., Туманов Ю. В., Гришаев М. П., Аммосов А. Д. // Тезисы I Всесоюзного совещания по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами». М., 1985. С. 58-59.

Поступила в редакцию  
21.VII.1986  
После доработки  
9.XII.1986

#### CHEMICAL SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE-5'-POLYPHOSPHO-5'-NUCLEOSIDES

TUMANOV Yu. V., GRISHAEV M. P., RUKAVISHNIKOV M. Yu., AMMOSOV A. D.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,  
Novosibirsk Region*

A method of chemical synthesis of nucleoside-5'-polyphospho-5'-nucleosides having regulatory and signal functions in the living cell is described. The method involves the activation of a nucleoside-5'-phosphate by 4-dimethylaminopyrimidine in the presence of the redox condensation reagents  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  and its interaction with another nucleoside phosphate. The straightforwardness of the approach and the possibility of varying the nature of nucleosides allow one to obtain symmetrical and asymmetrical dinucleoside polyphosphates (with the yields up to 40-75%) having polyphosphate chains of various length and, if necessary,  $^{32}\text{P}$ -labelled.