



УДК 577.113.6:578.865.1

N⁶-БЕНЗИЛАДЕНОЗИНОВЫЕ АНАЛОГИ (A2'p)₂A: СИНТЕЗ И АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

© 1996 г. **Е. И. Квасюк, Т. И. Кулак, А. И. Зинченко*,
В. Н. Барай*, И. А. Михайлопуло**

Институт биоорганической химии Академии наук Белоруссии, Минск;

** Институт микробиологии Академии наук Белоруссии, Минск*

Поступила в редакцию 28.06.95 г.

С помощью триэфирного метода синтеза олигонуклеотидов получены аналоги тримера (2'-5')олигоаденилата, содержащие N⁶-бензиладенозин в различных положениях цепи, а также полностью замещенный тример. Строение синтезированных соединений доказано с помощью УФ-, КД- и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Показано, что синтезированные соединения в концентрации 10⁻⁸–10⁻⁶ М обладают способностью ингибировать репликацию вируса табачной мозаики, сравнимой с таковой для природного триаденилата (A2'p)₂A.

Ключевые слова: нуклеозиды, нуклеотиды, (2'-5')олигоаденилаты, аналоги, противовирусная активность.

Интерес к (2'-5')олигоаденилатам обусловлен тем фактом, что их 5'-трифосфаты (в основном тример и высшие олигомеры) служат посредниками в многообразных биологических эффектах, возникающих в клетках при действии интерферона [1, 2]. Дефосфорилированные (2'-5')олигоаденилаты (A2'p)_nA, n ≤ 2–6, главным образом тример (A2'p)₂A, обладают способностью влиять на пролиферацию и дифференциацию клетки [3, 4], проявляют противовирусные свойства в клетках животного и растительного происхождения [5, 6], а также индуцируют цитокининовую активность в растительных тканях [7]. В клетках млекопитающих (2'-5')олигоаденилаты метаболически нестабильны и легко гидролизуются под действием 2'-фосфодиэстеразы и фосфатаз [8, 9] до нуклеозидов, которые проявляют присущие им активности. Напротив, в растительных клетках на примере листьев табака и экстрактов из них было показано, что 2',5'-фосфодиэстеразная активность отсутствует и активность в отношении ВТМ обусловлена действием непосредственно 2',6'-тримеров, а индивидуальные нуклеозиды и нуклеотиды, входящие в состав тримеров, противовирусным действием в условиях эксперимента не обладали [6].

Сокращения: ВАР – 6-бензиламинопурин; VzAde – N⁶-бензиладенин; ВТМ – вирус табачной мозаики; Cl-Ph – 2-хлорфенил; DBU – 1,8-диазабисцикло[5,4,0]ундецен-7; DMAP – диметиламинопиридин; Npe – 2-(4-нитрофенил)этил-; TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.

Природный тример (A2'p)₂A и ряд его аналогов ингибируют репликацию ВТМ на 53–93% в концентрации 10⁻⁸–10⁻⁷ М [6]. С целью поиска новых биологически активных соединений синтезированы разнообразные аналоги тримера (A2'p)₂A, модифицированные в углеводном фрагменте [10–15], по фосфатной части [16, 17] и в гетероциклическом основании [18, 19]. Представляют интерес также (2'-5')олигонуклеотиды, содержащие в качестве мономерных звеньев такие биологически активные вещества, как антибиотик кордицепин [20] или обладающие противовирусной активностью арабинофуранозиладенин, бромвинилдезоксисуридин и другие нуклеозиды [8, 21].

Чтобы выяснить зависимость между структурой и противовирусным действием (2'-5')олигомеров, мы синтезировали аналоги тримера (A2'p)₂A, содержащие в различных положениях цепи N⁶-бензиладенозин, и изучили их способность ингибировать репликацию ВТМ в листовых пластинках табака.

Синтез олигоаденилатов осуществлялся триэфирным методом с применением разработанной нами стратегии [22], основанной на использовании бензоильной и монометокситритильной защитных групп для нуклеозидов, 2-(4-нитрофенил)этильной и 2-хлорфенильной защит для фосфата и смеси TPS-Cl–тетразол (1 : 3) в качестве конденсирующего агента [23].

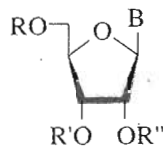
В результате реакции N⁶-бензиладенозина (I) [24] с монометокситритилхлоридом в пиридине

был получен N⁶-бензил-5'-О-монометокситритил-аденозин (II) с выходом 85%. Выделение блокированных нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов осуществлялось колоночной хроматографией на силикагеле. Бензоилирование соединения (II) бензоилцианидом в ацетонитриле [22] в присутствии триэтиламина и DMAP приводило к смеси соединений, из которой были выделены N⁶-бензил-2',3'-ди-О-бензоил-5'-О-монометокситритил-аденозин (III) (38%), N⁶-бензил-2'-О-бензоил-5'-О-монометокситритиладенозин (IV) (13%) и N⁶-бензил-3'-О-бензоил-5'-О-монометокситритиладенозин (V) (46%). Детритилированием дибензоата (III) действием 2% раствора TsOH в смеси хлористый метилен-метанол (7 : 3) был получен N⁶-бензил-2',3'-ди-О-бензоиладенозин (VI) (96%), который использовался в качестве терминального фрагмента в синтезе олигомеров. При взаимодействии бензоата (V) с бис-триазолидом 2-хлорфенилфосфата с последующей обработкой 2-(4-нитрофенил)этанолом был получен фосфотриэфир (VII). Удаление 2-хлорфенильной защитной группы соединения (VII) раствором 4-нитробензальдоксима в смеси диоксан-триэтиламин-вода (1 : 1 : 1) приводило к выделенному с суммарным выходом 82% фосфодиэфиру (VIII), который использовался в качестве надстраиваемого фрагмента в синтезе олигомеров. Синтез трибензоиладенозина (IX), динуклеозидмонофосфата (XV) и диэфира (X) описан нами ранее [25, 26].

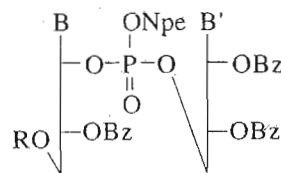
Конденсацией соединений (VI) и (X) в пиридине был получен полностью защищенный димер (XI), детритилирование которого раствором TsOH дало производное (XII) (85%). Взаимодействие соединения (XII) с фосфодиэфиром (X) приводило к полностью защищенному тринуклеозиддифосфату (XVIII), детритилированием которого был получен тример (XIX) (65%). Последовательная обработка соединения (XIX) раствором DBU в пиридине, затем насыщенным при 0°C раствором аммиака в метаноле и хроматография на DEAE-целлюлозе (HCO₃⁻-форма) приводили к аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-N⁶-бензиладенозину (XX) (81%).

Аналогичная схема была использована для синтеза аденилил(2'-5')-N⁶-бензиладенилил(2'-5')аденозина (XXIII), N⁶-бензиладенилил(2'-5')аденилил(2'-5')аденозина (XXVI) и N⁶-бензиладенилил(2'-5')-N⁶-бензиладенилил(2'-5')-N⁶-бензиладенозина (XXIX) (суммарные выходы 50, 44 и 32% соответственно).

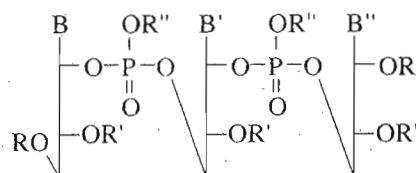
Строение синтезированных соединений подтверждено данными ¹H-ЯМР- (табл. 1), УФ- и КД-спектроскопии. Необходимо отметить, что в КД-спектрах тримеров (XX), (XXIII) и (XXIX) отсутствует характерный для (2'-5')олигоаденилатов переход в области 220 нм, тогда как КД-спектр соединения (XXVI) подобен спектру тримера (A2'p)₂A [27]. Это отличие обусловлено, вероятно,



	B	R	R'	R''
(I)	BAP	H	H	H
(II)	BAP	MeOTr	H	H
(III)	BAP	MeOTr	Bz	Bz
(IV)	BAP	MeOTr	H	Bz
(V)	BAP	MeOTr	Bz	H
(VI)	BAP	H	Bz	Bz
(VII)	BAP	MeOTr	Bz	PO(ONpe)OCiPh
(VIII)	BAP	MeOTr	Bz	PO(ONpe)OH
(IX)	BzAde	H	Bz	Bz
(X)	BzAde	MeOTr	Bz	PO(ONpe)OH



	B	B'	R
(XI)	BzAde	BAP	MeOTr
(XII)	BzAde	BAP	H
(XIII)	BAP	BzAde	MeOTr
(XIV)	BAP	BzAde	H
(XV)	BzAde	BzAde	H
(XVI)	BAP	BAP	MeOTr
(XVII)	BAP	BAP	H



	B	B'	B''	R	R'	R''
(XVIII)	BzAde	BzAde	BAP	MeOTr	Bz	Npe
(XIX)	BzAde	BzAde	BAP	H	Bz	Npe
(XX)	Ade	Ade	BAP	H	H	H
(XXI)	BzAde	BAP	BzAde	MeOTr	Bz	Npe
(XXII)	BzAde	BAP	BzAde	H	Bz	Npe
(XXIII)	Ade	BAP	Ade	H	H	H
(XXIV)	BAP	BzAde	BzAde	MeOTr	Bz	Npe
(XXV)	BAP	BzAde	BzAde	H	Bz	Npe
(XXVI)	BAP	Ade	Ade	H	H	H
(XXVII)	BAP	BAP	BAP	MeOTr	Bz	Npe
(XXVIII)	BAP	BAP	BAP	H	Bz	Npe
(XXIX)	BAP	BAP	BAP	H	H	H

Таблица 1. ^1H -ЯМР-спектры полученных соединений. Приведены химические сдвиги (δ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц)

Соединение	H-2 H-8	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5' а, б	Прочие	J		
								1', 2'	2', 3'	3', 4'
(II)	8.27с 8.13с	5.93д	4.36дд	4.30м	4.05м	3.21д	8.40с (1H, NH), 7.37–6.82м (ароматич.), 5.55д (1H, 2'-ОН), 5.22д (1H, 3'-ОН), 4.70с (2H, CH_2Ph), 3.71с (3H, OCH_3)	4.2	4.8	4.2
(III)	8.38с 8.17с	6.52д	6.47дд	6.20дд	4.60м	3.43м	8.53с (1H, NH), 7.94–6.79м (ароматич.), 4.72с (2H, CH_2Ph), 3.68с (3H, OCH_3)	4.8	4.8	4.8
(IV)	8.36с 8.20с	6.37д	6.09дд	4.90дд	4.22м	3.30м	8.50с (1H, NH), 8.07–6.83м (ароматич.), 5.75д (1H, 3'-ОН), 4.72с (2H, CH_2Ph), 3.71с (3H, OCH_3)	3.6	6.0	6.0
(V)	8.35с 8.14с	6.04д	5.23дд	5.64дд	4.39м	3.36д	8.47с (1H, NH), 8.07–6.80м (ароматич.), 5.98д (1H, 2'-ОН), 4.72с (2H, CH_2Ph), 3.67с (3H, OCH_3)	6.0	6.0	4.8
(VI)	8.49с 8.25с	6.54д	6.30дд	5.92дд	4.55м	3.83м	8.65с (1H, NH), 8.02–7.11м (ароматич.), 5.86м (1H, 5'-ОН), 4.72д (2H, CH_2Ph)	6.6	6.0	2.4
(VIII)	8.32с 8.13с	6.27д	5.65м	5.86дд	4.39м		8.49с (1H, NH), 8.03–6.79м (ароматич.), 4.70д (2H, CH_2Ph), 3.68с (3H, OCH_3)	6.0	6.0	4.8
(XX)	6.91с 6.83с 6.73с 6.71с 6.62с 6.51с	4.80д 4.67д 4.60д					6.13м (ароматич.)	4.2 3.6 4.8		
(XXIII)	6.86с 6.81с (2H) 6.77с 6.56с 6.39с	4.77д 4.73д 4.57д					6.08м (ароматич.)	4.8 4.8 3.6		
(XXVI)	6.92с 6.85с 6.73с 6.67с (2H) 6.50с	4.85д 4.67д 4.59д					6.07м (ароматич.)	4.8 4.2 4.8		
(XXIX)	6.88с 6.83с 6.79с 6.73с 6.57с 6.50с	4.82д 4.76д 4.62д					6.04м (ароматич.)	5.4 4.8 3.0		

влиянием бензильных заместителей в N⁶-положении аденина среднего и 2'-терминального нуклеозидных фрагментов соединений (XX), (XXIII) и (XXIX) на стэкинг-взаимодействие между гетерооснованиями.

Способность синтезированных олигомеров (XX), (XXIII), (XXVI) и (XXIX) ингибировать репликацию ВТМ была изучена в сравнении с тримером (A2'p)₂A в тесте на инфекционность [28] в листовых пластинках табака. ВТМ накапливали в

растениях *Nicotiana tabacum* L сорта Самсун и выделяли методом осаждения сульфатом аммония [29]. Для изучения местной некротической реакции на заражение ВТМ использовались листья табака *N. glutinosa*. Как видно из данных по ингибированию репликации ВТМ (табл. 2), соединения (XX), (XXIII), (XXVI) и (XXIX) обладают противовирусными свойствами. В изученных концентрациях 10⁻⁸–10⁻⁶ М их активность незначительно отличается от активности тримера (A2'p)₂A, эффективность действия которого согласуется с опубликованными данными [6]. Наличие бензильного заместителя в гетероосновании, а также местоположение бензиладенозина в цепи олигомера не оказывают значительного влияния на эффективность его противовирусного действия. Аналогичное незначительное различие в противовирусных свойствах тримера (A2'p)₂A и его инозинсодержащего аналога наблюдалось ранее [6]. На основании этих данных можно предположить, что природа заместителя при С⁶-атоме пуриновых гетерооснований (2'-5')олигомеров не оказывает существенного влияния на их способность ингибировать репликацию ВТМ. N⁶-Бензиладенозин в условиях эксперимента в аналогичном диапазоне концентраций не вызывал заметного изменения репликации ВТМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

УФ-спектры записаны на спектрофотометре Spcord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), ¹H-ЯМР-спектры – на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ), КД-спектры – на спектрополяриметре J-20 (Jasco, Япония). Для записи ¹H-ЯМР-спектров соединений (II)–(VI) и (VIII) использовались их растворы в DMSO-*d*₆ (внутренний стандарт – тетраметилсилан), для соединений (XX), (XXIII), (XXVI) и (XXIX) – растворы в D₂O (внутренний стандарт – *t*BuOH). ТСХ проводили на пластинках с силикагелем 60 F-254 (Merck, ФРГ) и на пластинках Silufol UV-254 (ЧСФР). Системы растворителей для ТСХ на пластинках фирмы Merck: хлороформ–метанол, 9 : 1 (А); гексан–этилацетат, 5 : 7 (Б); хлороформ–метанол, 4 : 1 (В); изопропиловый спирт–вода–концентрированный аммиак, 7 : 2 : 1 (Г); хлороформ–метанол, 24 : 1 (Д); для ТСХ на пластинках Silufol: хлороформ–метанол, 49 : 1 (Е); хлороформ–метанол, 19 : 1 (Ж). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (ЧСФР) и на DEAE-целлюлозе SS-23 (Serva, ФРГ).

N⁶,2',3'-О-Трибензоиладенозин (IX), N⁶,3'-О-добензоил-5'-О-монометокситритиладенозин-2'-(*n*-нитрофенилэтил)фосфат (X) и N⁶,3'-О-добензоиладенилил-{2'-[О-(P)-(n-нитрофенилэтил)фосфат]-5'}N⁶,2',3'-О-трибензоиладенозин (XV) были получены как описано нами ранее [25, 26].

Таблица 2. Влияние (2'-5')олигонуклеотидов на репликацию ВТМ в листовых пластинках табака

Соединение	Концентрация, М	Ингибирование, %
(XX)	1 × 10 ⁻⁸	28.6 ± 5.2
	1 × 10 ⁻⁷	35.4 ± 2.4
	1 × 10 ⁻⁶	52.4 ± 7.8
(XXIII)	1 × 10 ⁻⁸	38.6 ± 2.6
	1 × 10 ⁻⁷	44.3 ± 3.3
	1 × 10 ⁻⁶	51.7 ± 6.9
(XXVI)	1 × 10 ⁻⁸	7.0 ± 0.8
	1 × 10 ⁻⁷	56.4 ± 5.1
	1 × 10 ⁻⁶	60.7 ± 7.0
(XXIX)	1 × 10 ⁻⁸	7.2 ± 0.7
	1 × 10 ⁻⁷	50.0 ± 7.2
	1 × 10 ⁻⁶	59.1 ± 6.9
(A2'p) ₂ A	1 × 10 ⁻⁸	44.6 ± 3.6
	1 × 10 ⁻⁷	46.1 ± 4.1
	1 × 10 ⁻⁶	61.0 ± 6.8
Контроль	0	0

Продукты реакций в виде аморфных порошков были получены растворением соответствующих соединений, индивидуальных по данным ТСХ, в минимальном количестве хлороформа (2–5 мл) и последующим осаждением в гексан (100–500 мл).

N⁶-Бензил-5'-О-монометокситритиладенозин (II). К раствору 1.67 г (4.67 ммоль) соединения (I) в 17 мл пиридина при перемешивании добавили 2.01 г (6.54 ммоль) монометокситритилхлорида. Реакционную смесь выдержали 20 ч, затем добавили ее при энергичном перемешивании в 800 мл смеси лед–вода. Выпавший осадок отфильтровали, растворили в 150 мл хлороформа и проэкстрагировали водой (2 × 30 мл). Хлороформный раствор высушили безводным сульфатом натрия и упарили досуха. Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (150 см³), элюируя продукты реакции смесью хлороформа и метанола (линейный градиент концентрации метанола в хлороформе от 0.5 до 5 об. %, 1 л). Фракции, содержащие монометокситритильное производное (II), объединили и упарили досуха. Остаток кристаллизовали из этанола. Получили 2.5 г (85%) соединения (II), т. пл. 165–167°C; R_f 0.69 (А); УФ-спектр (MeOH), λ_{макс}, нм (lgε): 234 (4.21), 271 (4.30).

Бензоилирование соединения (II). К суспензии 1.0 г (1.59 ммоль) монометокситритильного производного (II) в смеси 30 мл ацетонитрила, 2.9 мл (20.64 ммоль) триэтиламина и 50 мг ДМАР добавили при перемешивании в течение 30 мин раствор 0.27 г (2.06 ммоль) бензоилцианида в 20 мл ацетонитрила. После полного растворения исходного

соединения реакционную смесь упарили досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (300 см³), элюируя продукты реакции смесью гексана и этилацетата (линейный градиент концентрации этилацетата в гексане от 20 до 67 об. %, 4 л). Фракции, содержащие индивидуальные соединения, объединили и упарили досуха. В порядке элюирования с колонки получили:

N⁶-Бензил-2',3'-ди-О-бензоил-5'-О-монометокситриладенозин (III), 0.5 г (38%) (аморфный порошок, получен осаждением в гексан); R_f 0.64 (Б); УФ-спектр (MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε): 232 (4.60), 272 (4.36).

N⁶-Бензил-2'-О-бензоил-5'-О-монометокситриладенозин (IV), 0.15 г (13%) (аморфный порошок); R_f 0.46 (Б); УФ-спектр (MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε): 233 (4.45), 272 (4.32).

N⁶-Бензил-3'-О-бензоил-5'-О-монометокситриладенозин (V), 0.54 г (46%) (аморфный порошок); R_f 0.36 (Б); УФ-спектр (MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε): 233 (4.48), 272 (4.34).

N⁶-Бензил-2',3'-ди-О-бензоиладенозин (VI). Растворили 100 мг (0.12 ммоль) соединения (III) в 10 мл 2% раствора TsOH в смеси хлористый метилен-метанол, 7 : 3. Реакционную смесь выдержали 10 мин, разбавили хлороформом до объема 100 мл и экстрагировали 0.05 М раствором TEAB (2 × 70 мл). Органический слой отделили, высушили и упарили досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (40 см³), элюируя продукты реакции хлороформом. Фракции, содержащие детритилированное производное (VI), объединили и упарили досуха. Получили 65 мг (95%) соединения (VI) (аморфный порошок); R_f 0.56 (Д); УФ-спектр (MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε): 232 (4.32), 272 (4.36).

N⁶-Бензил-3'-О-бензоил-5'-О-монометокситриладенозин-2'-(2-(4-нитрофенил)этил)фосфат (VIII). К раствору 92 мг (1.33 ммоль) 1,2,4-триазола в 1.3 мл пиридина добавили 160 мг (0.65 ммоль) 2-хлорфенилдихлорфосфата. Смесь перемешивали 10 мин, затем охладили до 0°C и добавили к ней при перемешивании в течение 15 мин раствор 320 мг (0.44 ммоль) соединения (V) в 0.9 мл пиридина. Реакционную смесь перемешивали 3 ч, затем добавили к ней 540 мг (3.25 ммоль) 2-(4-нитрофенил)этанола. Через 18 ч реакционную смесь разбавили хлороформом до 250 мл и экстрагировали 0.05 М раствором TEAB (2 × 100 мл). Органический слой отделили, высушили и упарили досуха. Остаток упарили с толуолом и хроматографировали на силикагеле (150 см³), элюируя продукты реакции хлороформом (1.5 л). Фракции, содержащие триэфир (VII) (R_f 0.67 (Б)), объединили и упарили досуха. Остаток обработали раствором 4-нитробензальдоксима (0.72 г, 4.33 ммоль) в 30 мл смеси диоксан-триэтиламин-вода (1 : 1 : 1). Реакционную смесь выдержали 20 ч при 4°C и

упарили досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (50 см³), элюируя продукты реакции хлороформом (0.5 л), затем смесью растворителей хлороформ-метанол-триэтиламин, 95 : 4 : 1 (0.3 л). Фракции, содержащие диэфир (VIII), объединили и упарили досуха. Получили 380 мг (82%) соединения (VIII) (аморфный порошок); R_f 0.44 (В); УФ-спектр (MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε): 233 (4.47), 272 (4.46).

Аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-N⁶-бензиладенозин (XX). К раствору 56 мг (0.1 ммоль) соединения (VI) и 151 мг (0.14 ммоль) фосфодиэфира (X) в 1 мл пиридина добавили 59 мг (0.84 ммоль) тетразола и 85 мг (0.28 ммоль) TPS-Cl. Реакционную смесь выдержали 16 ч, разбавили хлороформом до 50 мл и экстрагировали 0.05 М раствором TEAB (2 × 15 мл). Органический слой отделили, высушили и упарили досуха. Остаток, содержащий полностью блокированный динуклеозидмонофосфат (XI) (R_f 0.27 (Е)), растворили в 2% растворе TsOH и через 10 мин реакционную смесь обработали, как описано для соединения (VI). Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (50 см³), элюируя продукты реакции хлороформом (0.7 л). Фракции, содержащие детритилированный динуклеозидмонофосфат (XII), объединили и упарили. Получили 105 мг (85%) соединения (XII) (аморфный порошок); R_f 0.33 (Ж).

Конденсировали 105 мг (0.08 ммоль) димера (XII) и 127 мг (0.12 ммоль) фосфодиэфира (VIII) в 0.8 мл пиридина в присутствии 49 мг (0.71 ммоль) тетразола и 71 мг (0.24 ммоль) TPS-Cl, как при получении соединения (XI). Обработанную реакционную смесь, содержащую полностью блокированный тринуклеозидфосфат (XVIII) (R_f 0.39 (Ж)), детритилировали действием 11 мл 2% раствора TsOH, как описано для соединения (XII). Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (70 см³), элюируя продукты реакции смесью хлороформа и метанола (линейный градиент концентрации метанола в хлороформе от 0.05 до 2 об. %, 0.5 л). Фракции, содержащие детритилированное производное (XIX), объединили и упарили досуха. Получили 106 мг (65%) соединения (XIX) (аморфный порошок); R_f 0.34 (Ж).

К раствору 106 мг (0.055 ммоль) соединения (XIX) в 16.4 мл пиридина добавили 1.22 мл (8.19 ммоль) DBU. Реакционную смесь выдержали 18 ч, затем добавили к ней 82 мл 1 М раствора уксусной кислоты в пиридине и упарили. Остаток растворили в 20 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле, выдержали смесь 18 ч и упарили. Остаток хроматографировали на DEAE-целлюлозе (HCO₃⁻-форма), элюируя продукты реакции раствором бикарбоната триэтиламмония (линейный градиент концентрации от 0.001 до 0.2 М, 1 л). Фракции, содержащие тример (XX), объединили и лиофилизировали. Получили 54 мг (81%)

соединения (XX), суммарный выход в расчете на исходный дибензоат (VI) составил 45%, R_f 0.78 (Г); УФ-спектр (H₂O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 263 (4.52); КД-спектр (H₂O), λ , нм ($[\Theta] \times 10^{-3}$): 238 (0), 251 (-50.8), 262 (0), 273 (+54.8).

Аденилил(2'-5')-N⁶-бензиладенилил(2'-5')аденозин (XXIII). Реакция конденсации 40 мг (0.069 ммоль) трибензоиладенозина (IX) и 102 мг (0.096 ммоль) фосфодиэфира (VIII) в 0.7 мл пиридина в присутствии 59 мг (0.195 ммоль) TPS-Cl и 41 мг (0.585 ммоль) тетразола аналогично описанному в синтезе тримера (XX) приводила к полностью блокированному димеру (XIII), R_f 0.29 (Е), детритилированием которого действием 5.5 мл 2% раствора TsOH было получено 75 мг (87%) соединения (XIV), R_f 0.35 (Ж). Взаимодействие 75 мг (0.06 ммоль) соединения (XIV) и 91 мг (0.084 ммоль) фосфодиэфира (X) в 0.6 мл пиридина в присутствии 51 мг (0.168 ммоль) TPS-Cl и 35 мг (0.504 ммоль) тетразола, аналогично описанному выше, приводило к тримеру (XXI) (73%), R_f 0.29 (Ж), детритилирование которого действием 4.8 мл 2% раствора TsOH давало 85 мг (73%) соединения (XXII), R_f 0.24 (Ж). Деблокированием 85 мг (0.044 ммоль) тримера (XXII) действием раствора 1.0 г (6.568 ммоль) DBU в 13.2 мл пиридина с последующей обработкой раствором аммиака в метаноле и хроматографией на DEAE-целлюлозе (50 см³) получили 49 мг (79%) соединения (XXIII) (суммарный выход в расчете на исходный трибензоиладенозин (IX) составил 50%); R_f 0.64 (Г), УФ-спектр (H₂O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 263 (4.52); КД-спектр (H₂O), λ , нм ($[\Theta] \times 10^{-3}$): 235 (-12.4), 252 (-59.4), 265 (0), 277 (+40.6).

N⁶-Бензиладенилил(2'-5')аденилил(2'-5')аденозин (XXVI). Аналогично описанному в синтезе тримера (XX), реакция конденсации 32 мг (0.03 ммоль) диэфира (VIII) и 32 мг (0.025 ммоль) соединения (XV) в 0.25 мл пиридина в присутствии 18 мг (0.06 ммоль) TPS-Cl и 12.6 мг (0.18 ммоль) тетразола приводила к полностью блокированному тримеру (XXIV), R_f 0.53 (Д), детритилированием которого действием 2 мл 2% раствора TsOH получили 31 мг (63%) соединения (XXV), R_f 0.42 (Д). Обработкой 31 мг (0.016 ммоль) тримера (XXV) раствором 0.24 мг (1.6 ммоль) DBU в 3.2 мл пиридина с последующим действием раствора аммиака в метаноле и хроматографией на DEAE-целлюлозе получили 16 мг (82%) соединения (XXVI) (суммарный выход в расчете на димер (XV) составил 44%); R_f 0.70 (Г); УФ-спектр (H₂O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 263 (4.48); КД-спектр (H₂O), λ , нм ($[\Theta] \times 10^{-3}$): 213 (0), 220 (+44.0), 233 (+8.3), 238 (0), 252 (-53.5), 262 (0), 272 (+52.4).

N⁶-Бензиладенилил(2'-5')-N⁶-бензиладенилил(2'-5')-N⁶-бензиладенозин (XXIX). Аналогично описанному в синтезе тримера (XX), конденсация

40 мг (0.071 ммоль) соединения (VI) и 105 мг (0.099 ммоль) диэфира (VIII) в 0.7 мл пиридина в присутствии 60 мг (0.198 ммоль) TPS-Cl и 42 мг (0.597 ммоль) тетразола давала полностью блокированный димер (XVI), R_f 0.33 (Е), детритилированием которого действием 5.7 мл 2% раствора TsOH получили 71 мг (81%) соединения (XVII), R_f 0.43 (Ж). В результате реакции 85 мг (0.08 ммоль) фосфодиэфира (VIII) с 71 мг (0.57 ммоль) соединения (XVII) в 0.6 мл пиридина в присутствии 48 мг (0.16 ммоль) TPS-Cl и 34 мг (0.48 ммоль) тетразола был получен полностью блокированный тример (XXVII), R_f 0.35 (Ж), детритилированием которого действием 4.5 мл 2% раствора TsOH получили 57 мг (52%) соединения (XXVIII), R_f 0.32 (Ж). Деблокирование 57 мг (0.03 ммоль) тримера (XXVIII) действием раствора 0.68 г (4.5 ммоль) DBU в 9 мл пиридина и последующая обработка раствором аммиака в метаноле и хроматографией на DEAE-целлюлозе (50 см³) привели к соединению (XXIX) (27 мг, 76%) (суммарный выход в расчете на дибензоат (VI) составил 32%); R_f 0.80 (Г); УФ-спектр (H₂O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 270 (4.72); КД-спектр (H₂O), λ , нм ($[\Theta] \times 10^{-3}$): 237 (-17.2), 258 (-69.0), 269 (0), 283 (+86.2).

Ингибирование репликации вируса табачной мозаики. Суспензию, содержащую ВТМ, мелкозернистый карборунд в растворе (2'-5')олигонуклеотида, втирали в половинки изолированных листьев табака, которые затем помещали в чашки Петри и выдерживали 72 ч при комнатной температуре с периодическим освещением (по 12 ч с 12-часовыми промежутками). Контролем служили соответствующие половинки листьев, обработанные суспензией ВТМ и карборунда в воде. По окончании опыта подсчитывали количество некрозов, развившихся на контрольной (H_к) и опытной (H_о) половинках листа. Величину ингибирования репликации ВТМ рассчитывали по формуле

$$H_k - H_o / H_k \times 100\%$$

Степень ингибирования представляли в виде усредненных величин 4-6 экспериментов и стандартных ошибок среднего арифметического.

Авторы выражают благодарность Фонду фундаментальных исследований Республики Беларусь за финансовую поддержку проведенных исследований, а также сотрудникам института Н.Б. Хрипач и Г.С. Янковской за запись ¹H-ЯМР- и КД-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston M.I., Torrence P.F. // Interferon: Mechanism of Production and Action. V. 3 / Ed. R.M. Friedman. Amsterdam, New York: Elsevier Sci. Publ. B. V., 1984. P. 189-293.

2. Schroder H.C., Kelve M., Muller W.E.G. // Progress in Molecular and Subcellular Biology. V. 14 / Eds W.E.G. Muller, H.C. Schroder. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. P. 176–197.
3. Kimchi A., Shure H., Revel M. // Nature (London). 1979. V. 282. P. 849–851.
4. Leanderson T., Nordfelth R., Lundgren E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. P. 511–517.
5. Devash Y., Biggs S., Sela I. // Science. 1982. V. 216. P. 1415–1416.
6. Devash Y., Gera A., Willis D.H., Reichman M., Pfeleiderer W., Charubala R., Sela I., Suhadolnik R.J. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 3482–3486.
7. Тальянский М.З., Мальшиенко С.И., Каплан И.Б., Ложникова В.Н., Дудко И.В., Карпейский М.Я., Михайлов С.Н., Падыюкова Н.М., Огарков В.И., Атабеков И.Г., Чайлахян М.Х. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. С. 253–256.
8. Herdewijn P., Charubala R., De Clercq E., Pfeleiderer W. // Helv. Chim. Acta. 1989. V. 72. P. 1739–1748.
9. Eppstein D.A., Barnett J.W., Marsh Y.Y., Gosselin G., Imbach J.L. // Nature (London). 1987. V. 302. P. 723–724.
10. Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Pooreiko N.E., Kelve M., Saarma M., Mikhailopulo I.A., Van den Boogaart J.E., Altona C. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1995. V. 114. P. 43–50.
11. Mikhailov S.N., Pfeleiderer W. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 2059–2062.
12. Herdewijn P., Charubala R., Pauwels R., De Clercq E., Pfeleiderer W. // Nucleosides, Nucleotides. 1987. V. 6. P. 443–444.
13. Kovacs T., Pabuccuoglu A., Lesiak K., Torrence P.F. // Bioorgan. Chem. 1993. V. 21. P. 192–208.
14. Herdewijn P., Charubala R., Pfeleiderer W. // Helv. Chim. Acta. 1989. V. 72. P. 1729–1738.
15. Pfeleiderer W., Himmelsbach F., Charubala R. // Bioorgan. and Med. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 1047–1052.
16. Kariko K., Sobol R.W., Jr., Suhadolnik L., Li S.W., Reichenbach N.L., Suhadolnik R.J., Charubala R., Pfeleiderer W. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 7127–7135.
17. De Vroom E., Fidder A., Saris C.P., Van der Marel G.A., Van Boom J.H. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 9933–9943.
18. Kitade Y., Nakata Y., Hirota K., Maki Y., Pabuccuoglu A., Torrence P.F. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 4103–4108.
19. Charubala R., Pfeleiderer W., Sobol R.W., Li S.W., Suhadolnik R.J. // Helv. Chim. Acta. 1989. V. 72. P. 1354–1361.
20. Torrence P.F., Brozda D., Alster D., Charubala R., Pfeleiderer W. // Biochemistry. 1988. V. 263. P. 1131–1139.
21. Kwiatkowski M., Gioelli C., Chattopadhyaya J.B., Oberg B., Drake A.F. // Chem. Scr. 1982. V. 19. P. 49–56.
22. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Khrpach N.B., Mikhailopulo I.A., Uhlmann E., Charubala R., Pfeleiderer W. // Synthesis. 1987. P. 535–541.
23. Seth A.F., Jay E. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 5445–5449.
24. Зинченко А.И., Барай В.Н., Ляховец В.И., Кулак Т.И., Квасюк Е.И., Михайлопуло И.А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1401–1404.
25. Квасюк Е.И., Калиниченко Е.Н., Кулак Т.И., Подкopaева Т.Л., Михайлопуло И.А., Попов И.Л., Барай В.Н., Зинченко А.И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 1239–1247.
26. Квасюк Е.И., Кулак Т.И., Зайцева Г.В., Михайлопуло И.А., Пфляйдерер В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. С. 506–514.
27. Doornbus J., Charubala R., Pfeleiderer W., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 4569–4582.
28. Devash Y., Suhadolnik R.J., Sela I. // Methods Enzymol. 1986. V. 119. P. 759–761.
29. Тиббе А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. С. 120.

N^6 -Benzyladenosine Analogs of $(A2'p)_2A$: Synthesis and Activity to Tobacco Mosaic Virus

E. I. Kvasyuk, T. I. Kulak, A. I. Zinchenko*, V. N. Barai*, and I. A. Mikhailopulo

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences,
ul. Zhodinskaya 5/2, Minsk, 220141 Belarus*

**Institute of Microbiology, Belarussian Academy of Sciences, Minsk, Belarus*

Abstract—Analogues of $(2'-5')$ oligoadenylate trimer with N^6 -benzyladenosine in various positions of the chain and the fully-substituted trimer were synthesized by the phosphotriester method. The structures of compounds prepared were proved by UV, CD, and 1H NMR. The obtained substances inhibit replication of tobacco mosaic virus at 10^{-8} – 10^{-6} M concentration, which is comparable with that of natural $(A2'p)_2A$ triadenylate.

Key words: nucleosides; nucleotides; $(2'-5')$ oligoadenylates, analogs; antiviral activity.