



УДК 547.963.32.07

АМИНОНУКЛЕОЗИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

IX *. СИНТЕЗ КОРОТКИХ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ ФОСФАМИДНЫЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫЕ СВЯЗИ*Ажасев А. В., Озолс А. М., Краевский А. А.,
Гнучев Н. В., Готтих В. П.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Конденсацией имидазолил(N→P)аденозин-5'-фосфата с 3'-амино-3'-дезоксинуклеозидами осуществлен синтез аналогов динуклеозидфосфатов с N→P-связью; получены 3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')аденозин, 3'-амино-3'-дезоксиридилил(3'→5')аденозин, 3'-амино-3'-дезоксаденилил(3'→5')аденозин и 3'-амино-3'-дезоксигуанилил(3'→5')аденозин. Для синтеза соединений подобного типа, когда нуклеотидным компонентом является цитидин-5'-фосфат или его аналоги, лучший выход олигонуклеотидов получен при конденсации с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид в водной среде. Указанным методом синтезированы 3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')аденозин, 3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-азидо-3'-дезоксиденозин и 3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-амино-3'-дезоксаденозин. При конденсациях гидроксильные группы сахаров и ампрогруппы оснований не требовали защиты.

Олигонуклеотиды, содержащие межнуклеотидные фосфамидные связи, являясь аналогами олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов, представляют определенный интерес с химической, физико-химической и биологической точек зрения. В настоящее время известен ряд методов синтеза 2'-дезоксиолигонуклеотидов, содержащих фосфамидные (3'→5')-межнуклеотидные связи O→P→NH, исходя из 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозидов [2-8]; методы различаются способами активации фосфатного компонента.

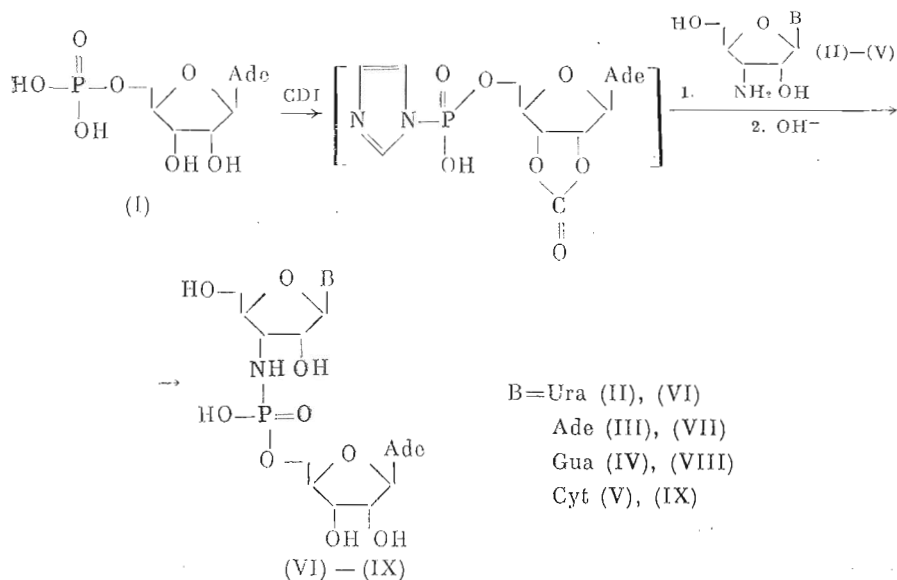
Ранее мы сообщали о предварительных результатах по синтезу коротких олигорибонуклеотидов, в состав которых входят 3'-амино-3'-дезоксинуклеозиды [9]. В настоящей публикации приводится общий метод получения аналогов динуклеозидфосфатов и тринуклеозиддифосфатов, содержащих 3'(NH→P→O)5'-связи.

Динуклеозидфосфаты указанного типа были синтезированы, исходя из 3'-амино-3'-дезоксинуклеозидов (II)–(V), полученных как описано в работах [10, 11] (схема 1). Соединения (VI)–(IX) были синтезированы с помощью активации фосфатной группы нуклеотида (I) N, N'-карбонилдимидазолом (метод А [1, 9]). После образования динуклеозидфосфатов карбонильный остаток с 2', 3'-*цис*-диольной группировки удалялся мягким щелочным гидролизом. Во всех случаях нуклеозиды (II)–(V) вводились в реакцию в полутора кратном избытке.

Попытка синтезировать 3'-амино-3'-дезоксцитидилил(3'→5')-3'-азидо-3'-дезоксцитидин (XII) по методу А была неудачной. При активации 5'-фосфата 3'-азидо-3'-дезоксцитидина (X) с помощью N, N'-карбонилдимидазола проходили побочные реакции, приводившие к образованию сложной смеси продуктов (выход производного (XII) составлял 5%). Однако предварительное ацетилирование фосфата (X), конденсация имидазолида 3'-азидо-3'-дезоксиденозин-4-N-2'-O-диацетилцитидин-5'-фосфата (XI) с

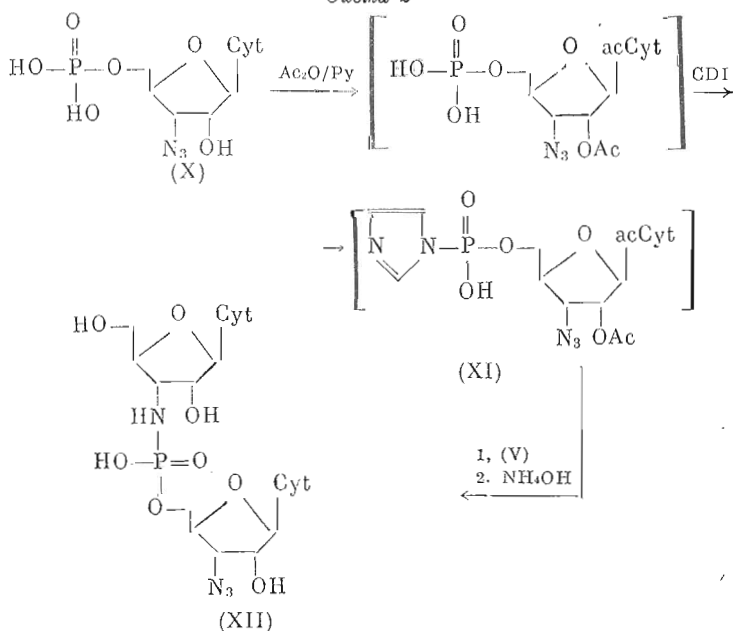
* Сообщение VIII см. [1]. В работе приняты следующие нестандартные сокращения: CDI – N, N'-карбонилдимидазол, EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Схема 1



нуклеозидом (V) и последующий щелочной гидролиз дали соединение (XII) с выходом 47% (схема 2).

Схема 2

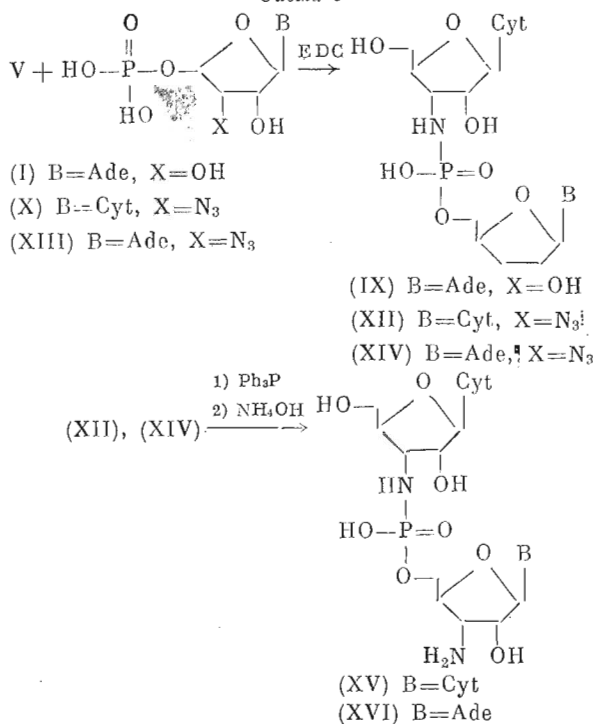


Очевидно, что необходимость ацелирования нуклеотида (X) несколько усложняет метод синтеза аналогов динуклеозидфосфатов, поэтому был предложен альтернативный способ получения фосфамидных производных конденсацией аминонуклеозидов, взятых в двукратном количестве, с нуклеозид-5'-фосфатами (в виде свободных кислот) в воде в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (метод *B* [1]).

С помощью этого метода нами были получены динуклеозидфосфаты (IX), (XII), (XIV). Азиды (XII), (XIV) были восстановлены в амины (XV), (XVI) с помощью трифенилфосфина (схема 3).

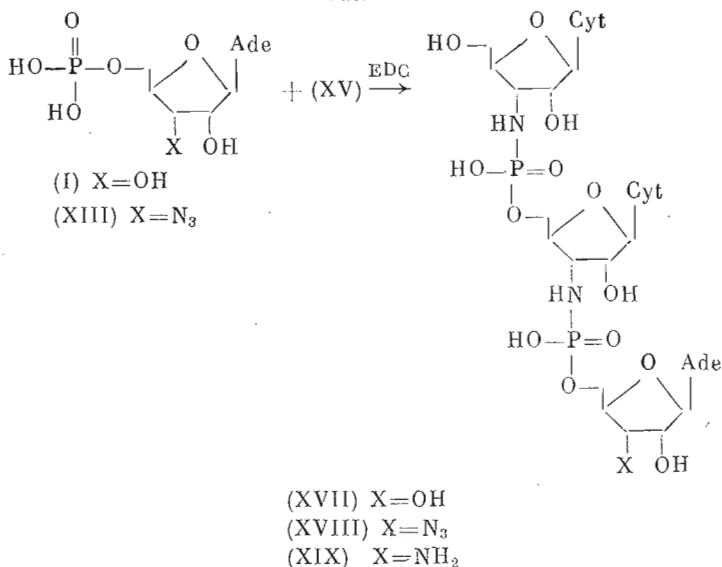
Методом *B* мы также воспользовались при синтезе тринуклеозиддифосфатов. Конденсация динуклеозидфосфата (XV) с нуклеотидом (I) или 3'-азидо-3'-дезоксаденозин-5'-фосфатом (XIII) с помощью водорастворимого карбодимидом приводила к тринуклеозиддифосфатам (XVII) и

Схема 3



(XVIII) - Азид (XVIII) был восстановлен в амин (XIX) действием трифенилфосфина в смеси пиридин - водный аммиак (схема 4).

Схема 4



Метод B был успешно использован нами для получения олигонуклеотидов, содержащих в качестве мономерных звеньев 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозиды [12].

Выходы и некоторые свойства синтезированных коротких олигонуклеотидов даны в табл. 1. Гомогенность аналогов олигонуклеотидов проверялась с помощью ТСХ, электрофореза на бумаге и ВЭЖХ.

В табл. 2 суммированы данные ЯМР-спектров. Структура полученных соединений подтверждена также гидролизом при слабых значениях pH и действием рибонуклеазы А в случае соединений (VI), (IX), (XII), (XIV) - (XIX), рибонуклеазы T₂ в случае динуклеозидфосфата (VII) и

Выходы и некоторые характеристики полученных соединений

Соединение	Выход, % по методу		R_f в системе		Электрофорез		ВЭЖХ, время удерживания, мин	УФ, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	
	А	Б	А	Б	$E_{\text{pH}}^{\text{pH}} 2,5$ А	$E_{\text{pH}}^{\text{pH}} 7,5$ РА		pH 2,5	pH 7,0
(VI)	39	—	0,25	0,39	—	0,45	14,96	—	260
(VII)	32	—	0,17	0,60	0,32	0,36	15,37	—	256
(VIII)	32	—	0,19	0,32	0,23	0,32	18,15	—	255
(IX)	38	80	0,14	0,50	0,63	0,41	5,78	262, 282 п **	260
(XII)	47	82	0,17	0,64	0,64	0,49	—	276	268
(XIV)	—	80	0,24	0,53	0,48	0,31	—	262, 282 п **	261
(XV)	—	95	0,08	0,43	1,18	0,47	—	276	268
(XVI)	—	89	0,10	0,41	1,44	0,32	—	272, 282 п **	261
(XVII)	—	30	0,08	0,19	0,51	0,62	16,07	268	263
(XVIII)	—	44	0,06	0,48	0,49	0,59	17,23	267	261
(XIX)	—	95	0,03	0,28	0,89	0,59	—	267	262

* Знак «—» — эксперимент не проведен.

** п — плечо.

Таблица 2

 ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектры синтезированных соединений (δ , м. д., в D_2O)

Соединение	H-8	H-2	H-6 ($J_{5,6}$, Гц)	H-5	H-1' ($J_{1', 2'}$, Гц)	Другие протоны *	αP
(VI)	8,56с	8,32с	7,90д(8,0)	5,61д	6,14д(3,0) Ado, 5,63с Urd	5,00–3,32м	6,61с
(VII)	8,65 с, 8,56с	8,59с, 8,31с			6,27д(2,8), 6,30с 2Ado	5,28–3,62м	6,68с
(VIII)	8,25с Ado, 7,85с Guo	8,13с			5,98д(2,8) Ado, 5,85с Guo	4,80–3,32м	6,63с
(IX)	8,49с	8,21с	7,91д(7,5)	5,79д	6,07д(2,8) Ado, 5,61с Cyd	4,80–3,23м	6,66с
(XII)			7,99д(7,5), 7,96д(7,5)	5,89д, 5,87д	5,80д(1,5), 5,69с 2Cyd	5,16–3,15м	6,67с
(XIV)	8,45с	8,21с	8,03д(8,0)	5,83д	6,05д(3,0) Ado, 5,56с Cyd	5,12–3,30м	6,62с
(XV)			8,12д(7,5) 8,09д(7,5)	5,91д 5,87д	5,80с, 5,67с 2Cyd	4,80–3,35м	6,63с
(XVI)	8,41с	8,14с	7,89д(8,0)	5,71д	6,17д(2,5) Ado, 5,55с Cyd	5,08–3,15м	6,61с
(XVII)	8,55с	8,30с	8,07д(7,5) 7,99д(7,5)	5,80д, 5,62д	6,01д(4,0) Ado, 5,64с, 5,62с 2Cyd	4,90–3,10м	6,61с, 6,48с
(XVIII)	8,37с	8,19с	8,03д(7,5) 7,95д(7,5)	5,75д, 5,51д	6,08д(5,0) Ado, 5,63с, 5,60с 2Cyd	4,93–3,13м	6,64с, 6,47с
(XIX)	8,43с	8,09с	8,00д(7,5) 7,95д(7,5)	5,88д, 5,55д	6,10д(3,5) Ado, 5,61с, 5,53с 2Cyd	5,00–3,10м	6,62с, 6,48с

* Перекрываются с сигналом HOD.

рибонуклеазы T_1 в случае динуклеозидфосфата (VIII) (соотношение аминоклеозид — нуклеотид близко к 1:1 в случае динуклеозидфосфатов; соотношение 3'-амино-3'-дезокситидин — адениловый нуклеотид близко к 2:1). Рибонуклеаза S_1 не расщепляла синтезированных олигонуклеотидов.

В случае аминоклеозидных нуклеозидов синтез соответствующих олигонуклеотидов по схемам 1, 3 и 4 осуществлялся без применения дополнительных защитных групп для сахарных остатков и гетероциклических оснований. Это позволяет надеяться, что полученные результаты окажутся полезными для исследований, связанных с синтезом аналогов олигонуклеотидов.

Использовали N,N' -карбонилдимидазол (Ferak) и 1-этил-3-(диметиламинопропил)карбодимид (Aldrich).

ТСХ проводили на стандартных пластинках с силикагелем Silufol UV 254 (ЧССР) в системах: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 3 : 2 : 1 (А), изопропанол — вода — 25% NH_4OH , 7 : 2 : 1 (Б). Электрофорез выполняли на бумаге Whatman 1 (Англия) в 6% уксусной кислоте (рН 2,5) или в 0,02 М ТЕАВ (рН 7,5) при 22 В/см в течение 1 ч. ВЭЖХ проводили на сорбенте APS-Hypersil (Shandon, Southern Products, Англия). Колонка из нержавеющей стали (0,4×30 см) наполнялась носителем в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Жидкостный хроматограф Varian 8500 (США) использовали для анализа полученных соединений. Для анализа динуклеозидфосфатов сначала осуществляли промывку водой (5 мин) и затем соединения элюировали градиентом концентраций KH_2PO_4 и метанола (H_2O — 0,135 М KH_2PO_4 в 1,5% метаноле, 15 мин). В случае тринуклеозиддифосфатов применяли промывку 0,045 М KH_2PO_4 в 0,5% метаноле (5 мин), а затем соединения элюировали линейным градиентом концентраций KH_2PO_4 и метанола (0,045 М KH_2PO_4 в 0,5% метаноле — 0,315 М KH_2PO_4 в 3,5% метаноле, 15 мин). Поглощение элюатов при 260 нм детектировалось с помощью детектора Varian UV-50 (США).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman 25 (США); спектры ^1H -ЯМР — на спектрометре Varian XL 100—15 (США) с частотой 100 МГц в D_2O с *трет*-бутанолом в качестве внутреннего стандарта. Спектры ^{31}P -ЯМР были сняты на том же приборе при рабочей частоте 40,5 МГц в D_2O , внутренним стандартом служил KH_2PO_4 . В ЯМР-спектрах приняты обозначения: с — синглет, д — дублет, м — мультиплет.

Гидролиз полученных соединений разбавленной уксусной кислотой, расщепление нуклеазами и анализ продуктов этих расщеплений проводили аналогично тому, как описано в работе [9].

Динуклеозидфосфаты (VI)–(IX) (метод А). Смесь 53,5 г (0,1 ммоль) нуклеотида (I) (H^+ -форма) и 31 мг (0,2 ммоль) CDI в 1 мл DMF перемешивали 30 мин при $\sim 20^\circ\text{C}$. К смеси добавляли 0,1 мл метанола, который через 30 мин упаривали. К полученному раствору добавляли раствор 0,15 ммоль нуклеозида (II), (III) и (V) в 1 мл DMF либо нуклеозида (IV) в 1 мл DMSO и смесь оставляли перемешиваться на 5–7 сут при $\sim 20^\circ\text{C}$ (в случае нуклеозида (V) нагревали 4 ч при 50°C). К полученному раствору добавляли 30 мл 5% водного триэтиламина. Через 2 ч перемешивания при $\sim 20^\circ\text{C}$ смесь упаривали досуха. Остаток растворяли в 100 мл воды и раствор наносили на колонку (5×25 см) с целлюлозой DE-32 (HCO_3^-). Элюцию проводили раствором NH_4HCO_3 с линейным градиентом концентрации (0–0,1 М, 7,5 л, рН 7,5). Фракции, содержащие динуклеозидфосфаты (V)–(IX) (элюирующая концентрация 0,04–0,06 М), собирали, упаривали досуха, остаток растворяли в воде и упаривали еще раз. Процедуру повторяли до удаления NH_4HCO_3 , после чего растворяли в 10 мл воды и лиофильно высушивали. Выход приведен в табл. 1.

Динуклеозидфосфат (XII) (метод А). Раствор 0,78 мл уксусного ангидрида в 1,6 мл пиридина добавляли к 50 мг (0,144 ммоль) фосфата (X) (H^+ -форма) [10] и смесь оставляли на ночь при $\sim 20^\circ\text{C}$. Смесь упаривали досуха, добавляли пиридин (10 мл) и упаривали. Операцию повторяли 3 раза. К остатку добавляли 4 мл 50% водного пиридина, оставляли на 2 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$, вносили 3,5 мкл три-*n*-бутиламина, смесь упаривали досуха, переупаривали с пиридином (2×10 мл) и DMF (2×3 мл). Остаток растворяли в 2 мл DMF, к раствору добавляли 118 мг (0,72 ммоль) CDI и перемешивали 2 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$. К раствору добавляли 0,1 мл метанола, через 30 мин метанол упаривали, приливали раствор 70 мг (0,288 ммоль) нуклеозида (V) и оставляли на 3 сут при $\sim 20^\circ\text{C}$. Растворитель упаривали, к остатку добавляли 20 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле и оставляли на ночь при $\sim 20^\circ\text{C}$. Метанол упаривали и далее

очистку производного (XII) проводили аналогично описанному для олигонуклеотидов (VI)–(IX). Выход 40 мг.

Динуклеозидфосфаты (IX), (XII), (XIV) (метод Б). К раствору 97 мг (0,4 ммоль) нуклеозида (V) и 0,2 ммоль соответствующего нуклеотида (II⁺-форма) (I), (X) или (XIII) [10] в 3 мл воды добавляли 192 мг (1 ммоль) EDC, раствор перемешивали 4 ч при ~20°С, приливали 100 мл воды и наносили на колонку (5×25 см) с сефадексом А-25 (НСО₃⁻). Элюцию проводили ТЕАВ в градиенте концентрации (0–0,1 М, 4 л, рН 7,5). Фракции, выходящие при концентрации буфера 0,05–0,06 М, собирали, упаривали досуха, переупаривали с этанолом (5×20 мл), растворяли в 10 мл воды и лиофильно высушивали. Выход 95 мг для аналога (IX), 98 мг для производного (XII) и 99 мг для производного (XIV).

Динуклеозидфосфаты (XV) и (XVI). К раствору 0,16 ммоль азидоолигонуклеотида (XII) или (XIV) в смеси 3 мл пиридина и 3 мл конц. NH₄OH добавляли 104 мг (0,4 ммоль) трифенилфосфина. Смесь перемешивали 6 ч при ~20°С, растворители упаривали досуха, остаток переупаривали с толуолом (2×5 мл) и обрабатывали 20 мл воды и 20 мл эфира. Водный слой отделяли, промывали эфиром (3×20 мл), упаривали до объема 10 мл и лиофильно высушивали. Выход 85 мг для производного (XV) и 83 мг для производного (XVI).

Тринуклеозиддифосфаты (XVII) и (XVIII). К раствору 57 мг (0,1 ммоль) динуклеозидфосфата (XV) (Na⁺-форма) и 17 мг (0,05 ммоль) нуклеотида (I) (H⁺-форма) или 18,5 мг (0,05 ммоль) нуклеотида (XIII) (H⁺-форма) в 2 мл воды добавляли 39 мг (0,25 ммоль) EDC, перемешивали 4 ч при ~20°С, к смеси приливали 100 мл воды и наносили на колонку (5×25 см) с целлюлозой DE-32 (НСО₃⁻). Элюцию проводили раствором NH₄НСО₃ с линейным градиентом концентрации (0–0,2 М, 7,5 л, рН 7,5). УФ-поглощающие фракции, выходящие при элюирующей концентрации 0,12 М, собирали, упаривали досуха, остаток растворяли в воде и упаривали. Процесс повторяли до удаления NH₄НСО₃, остаток растворяли в воде и лиофильно высушивали. Выход производного (XVII) 14 мг, а производного (XVIII) — 20,5 мг.

Тринуклеозиддифосфат (XIX). К раствору 32 мг (0,034 ммоль) аналога (XVIII) в смеси 1 мл пиридина и 1 мл конц. NH₄OH добавляли 27 мг (0,103 ммоль) трифенилфосфина, оставляли на 5 ч при ~20°С и обрабатывали как описано для динуклеозидфосфатов (XV) и (XVI). Выход 29,5 мг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Озол А. М., Косенюк А. В., Дяткина Н. Б., Ажаев А. В., Куханова М. К., Краевский А. А., Гортух Б. П., Смирт И. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1307–1315.
2. Jastoff B., Hettler H. Chem. Ber., 1969, v. 102, № 12, p. 4119–4127.
3. Letsinger R. L., Mungall W. S. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 11, p. 3800–3803.
4. Mungall W. S., Greene G. L., Heavner G. A., Letsinger R. L. J. Org. Chem., 1975, v. 40, № 11, p. 1659–1664.
5. Letsinger R. L., Heavner G. A. Tetrahedron Lett., 1975, № 2, p. 147–150.
6. Hata T. In: Synthesis, structure and chemistry of transfer ribonucleic acids and their components, M. Wiewiorowski, ed., Poznan: 1976, p. 341–358.
7. Greene G. L., Letsinger R. L. Nucl. Acids Res., 1975, № 7, p. 1123–1127.
8. Gibbs D. E. Tetrahedron Lett., 1977, № 8, p. 679–682.
9. Azhayev A. V., Kravetsky A. A., Smrt J. Coll. Chem. Commun., 1979, v. 44, № 3, p. 792–798.
10. Azhayev A. V., Ozols A. M., Bushnev A. S., Dyatkina N. B., Kochetkova S. V., Victorova L. S., Kukhanova M. K., Kravetsky A. A., Gotlikh B. P. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 2, p. 625–643.
11. Ozols A. M., Azhayev A. V., Dyatkina N. B., Kravetsky A. A. Synthesis, 1980, v. 7, № 7, p. 557–559.
12. Kravetsky A. A., Azhayev A. V., Kukhanova M. K., Scarpova N. V., Zayceva V. E. Nucl. Acids Res., Symp. Ser., 1981, № 9, p. 203–205.

Поступила в редакцию
26.III.1982

AMINONUCLEOSIDES AND THEIR DERIVATIVES. IX. SYNTHESIS
OF SHORT OLIGORIBONUCLEOTIDES WITH PHOSPHORAMIDE
INTERNUCLEOTIDE BONDS

AZHAYEV A. V., OZOLS A. M., KRAYEVSKY A. A., GNUTCHEV N. V.,
GOTTIKH B. P.

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

3'-Deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-adenosine, 3'-deoxy-3'-aminouridyl-(3'→5')-adenosine, 3'-deoxy-3'-aminoadenyl-(3'→5')-adenosine and 3'-deoxy-3'-aminoguanilyl-(3'→5')-adenosine were synthesized by condensation of adenosine 5'-imidazolyl-(N→P)phosphate with 3'-deoxy-3'-aminonucleosides. When preparing of the dinucleoside monophosphate analogs with cytidine 5'-phosphate as nucleotide component, higher yields were obtained with water-soluble carbodiimide in aqueous media. In such manner, 3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-adenosine, 3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-3'-deoxy-3'-azido-adenosine and 3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-3'-deoxy-3'-aminocytidyl-(3'→5')-3'-deoxy-3'-aminoadenosine were synthesized. No protection of either sugar hydroxyls or base amino groups was employed.