



УДК 577.113.6:547.963.32

ХИМИЧЕСКОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ
5'-ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ (2' → 5')ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ

Квасюк Е. И., Калниченко Е. И., Кулак Т. И.,
Подкопаева Т. Л., Михайлопуло И. А., Попов И. Л. *,
Барай В. Н. *, Зимченко А. И. *

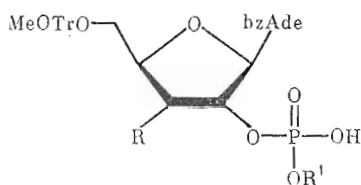
Институт биорганической химии Академии наук БССР, Минск;

* Институт микробиологии Академии наук БССР, Минск

Изучено химическое и микробиологическое 5'-фосфорилирование (2' → 5') олигоаденилатов. Исходными соединениями химического фосфорилирования служили защищенные (2' → 5') тример и его 3'-дезоксиналог, у которых была селективно деблокирована концевая 5'-гидроксильная группа. В качестве фосфорилирующих агентов были использованы хлорокись фосфора, β-цианэтилфосфат и пиррофосфорилхлорид. После полного удаления защитных групп были получены 5'-монофосфаты (2' → 5') тримера и его 3'-дезоксиналога. Предложен микробиологический подход к получению 5'-монофосфатов (2' → 5') тримеров с помощью интактных клеток *Erwinia herbicola* 47/3 и *n*-нитрофенилфосфата в качестве донора фосфатной группы. Показано, что при переходе от мономеров к (2' → 5') димерам и далее к (2' → 5') тримерам эффективность фосфотрансферной реакции снижается. Соединения, у которых отсутствует 3'-гидроксильная группа, обнаружили меньшую субстратную активность в сравнении с аденозином и его (2' → 5') олигомерами.

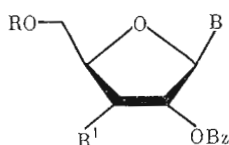
Данные о важном биологическом значении 5'-трифосфатов (2' → 5') олигоадениловой кислоты ((2'-5')pppA(pA)_n, где n ≥ 2) стимулировали развитие исследований по синтезу (2' → 5') олигоаденилатов (2'-5')A_n, «коровые» фрагменты; n, как правило, равно 3), их 5'-моно- и трифосфатов, а также разнообразных аналогов (см. работу [1] и приведенные в ней ссылки). Ранее нами был разработан препаративный метод синтеза (2' → 5') тримера адениловой кислоты [(2'-5')A₃] (XVI) [2] и описан подход к синтезу его 3'-дезоксиналога ((2'-5')(3'dA)₃) (XX) [4]. В настоящей работе проведено сравнительное исследование по синтезу 5'-монофосфатов упомянутых выше тримеров, (2'-5')pA₃ (XVIII) и (2'-5')p(3'dA)₃ (XXII) соответственно (см. схему), с использованием двух подходов: химического в рамках предложенной ранее стратегии синтеза «коровых» тримеров [1, 2] и микробиологического, описанного нами на примере превращения аденозина в аденозин-5'-монофосфат [3]. Было изучено химическое фосфорилирование (2' → 5') тримеров с использованием трех реагентов: хлорокиси фосфора, β-цианэтилфосфата и пиррофосфорилхлорида. Из них ранее для синтеза 5'-монофосфатов (2' → 5') тримеров был использован только последний [4]. Альтернативные химические методы синтеза 5'-монофосфатов (2' → 5') тримеров описаны в работах [5-11]. Изучение микробиологического подхода было направлено на разработку в дальнейшем препаративного метода получения 5'-монофосфатов (2' → 5') тримеров; при этом представляло интерес сравнить субстратную активность мономеров, димеров и тримеров. Ранее было показано, что для 5'-монофосфорилирования (2' → 5') тримеров могут быть использованы полинуклеотидкиназа [5, 12] и экстракт проростков пшеницы [12].

Сокращения: ClPh — 2-хлорфенил, pNEt — 2-(4-нитрофенил)этил, DBU — 1,8-диазабидицикло[5,4,0]ундецен-7, CNEt — β-цианэтил, NPP — *n*-нитрофенилфосфат, 3'dAdo — 3'-дезоксиаденозин.



(I) R = OBz, R' = pNEt

(II) R = H, R' = ClPh

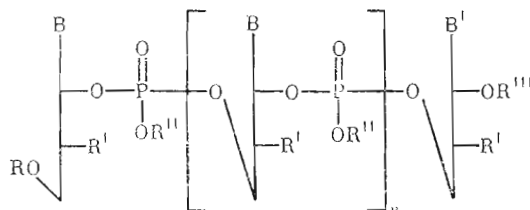


(III) R = MeOTr, R' = OBz,

B = bzAde

(IV) R = H, R' = OBz, B = bzAde

(V) R = R' = H, B = bz₂Ade



Соединение	n	R	R'	R''	R'''	B	B'
(VI)	0	MeOTr	OBz	pNEt	Bz	bzAde	bzAde
(VII)	1						
(VIII)	0	H	OBz	pNEt	Bz	bzAde	bzAde
(IX)	1						
(X)	0	MeOTr	H	ClPh	Bz	bzAde	bz ₂ Ade
(XI)	1						
(XII)	0	H	H	ClPh	Bz	bzAde	bz ₂ Ade
(XIII)	1						
(XIV)	1	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—POCNEt} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	H	ClPh	Bz	bzAde	bz ₂ Ade
(XV)	0	H	OH	H	H	Ade	Ade
(XVI)	1						
(XVII)	0	—PO(OH) ₂	OH	H	H	Ade	Ade
(XVIII)	1						
(XIX)	0	H	H	H	H	Ade	Ade
(XX)	1						
(XXI)	0	—PO(OH) ₂	H	H	H	Ade	Ade
(XXII)	1						

В синтезе всех исходных димеров и тримеров была использована методология, описанная ранее [1, 2], но вместо 6-N, 6-N,2'-O,3'-O-тетрабензоил-аденозина в качестве терминального фрагмента был использован 6-N,2'-O,3'-O-трибензоил-аденозин (IV). Последний был получен детритилированием 5'-O - монометокситритил-6-N,2'-O,3'-O - трибензоил-аденозина (III) [13]. В качестве конденсирующего агента была использована смесь хинолин-8-сульфохлорида - 3-нитро-1,2,4-триазол, 1:3 [14], удаление монометокситритильной защитной группы осуществлялось, если не отмечено особо, 2% раствором *n*-толуолсульфокислоты в смеси растворителей хлористый метилен - метанол, 7:3 [15]. Конденсацией диэфира (I) [13, 16] и бензоата (IV) с последующей хроматографией на силикагеле был получен полностью защищенный димер (VI), последовательная обработка которого 0,5 M раствором 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундецена-7 (DBU) в пиридине [17], концентрированным водным раствором аммиака и 80% уксусной кислотой давала аденилил(2'→5')аденозин[(2'-5')A₂] (XV), выделенный хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (HCO₃⁻-форма) с суммарным выходом 72%. Селективным удалением монометокситритильной группы в соединении (VI) и последующей конденсацией с диэфиром (I) выделен после хроматографии на силикагеле полностью защищен-

ный тример (VII) с выходом 72%. Деблокированием последнего и хроматографией в условиях, описанных при получении димера (2'-5')A₂, был получен аденилил-(2'→5')аденилил(2'→5')аденозин[(2'-5')A₃] (XVI) с суммарным выходом 49%, включая все стадии конденсации и деблокирования.

Селективное детритилирование соединения (VII) и последующая хроматография на силикагеле давали тример (IX) с выходом 81%. Последовательной обработкой тринуклеозиддифосфата (IX) хлорокисью фосфора в триметилфосфате [18] при 0°С в течение 2 ч, осаждением продукта реакции эфиром [19], его омылением смесью пиридин — вода, 4:1, деблокированием раствором DBU в пиридине, концентрированным водным раствором аммиака и хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (НСО₃⁻-форма) был получен 5'-монофосфат (2'-5') A₃[(2'-5')pA₃] (XVIII) с выходом 52%. При использовании пиррофосфорилхлорида [4] вместо хлорокиси фосфора фосфат (XVIII) был получен с выходом 45%. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенная стратегия синтеза достаточно эффективна как для синтеза тримера (XVI), так и его 5-монофосфата (XVIII).

В синтезе 3'-дезоксаденозиновых олигомеров в качестве мономерных блоков были использованы диэфир (II) [13] и 6-N,6-N,2'-O-трибензоил-3'-дезоксадепозин (V) [4, 20]. Конденсацией соединений (II) и (V) и последующей хроматографией на силикагеле был получен полностью защищенный динуклеозидмонофосфат (X), последовательная обработка которого 2% раствором *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол, 7:3, *n*-нитробензальдоксимом [21], насыщенным при 0°С раствором аммиака в метаноле и хроматография на DEAE-сефадексе А-25 (НСО₃⁻-форма) приводили к 3'-дезоксаденилил(2'→5')-3'-дезоксаденозину [(2'-5')(3'dA)₂] (XIX) с суммарным выходом 29%. Селективное детритилирование димера (X), удлинение цепи в результате реакции с диэфиром (II), полное деблокирование тримера (XI) и хроматография, как описано выше при получении димера (XIX), приводили к 3'-дезоксаденилил(2'→5')-3'-дезоксаденилил(2'→5')-3'-дезоксаденозину [(2'-5')·(3'dA)₃] (XX) с суммарным выходом 15%, включая все стадии конденсации и деблокирования.

Селективное детритилирование соединения (XI) и последующая хроматография на силикагеле давали тример (XIII) с выходом 80%. Конденсация последнего с β-цианэтилфосфатом [22] в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида в пиридине [23] и последующая хроматография на силикагеле приводили к защищенному тринуклеозидтрифосфату (XIV) с выходом 93%. Удаление всех защитных групп в соединении (XIV) было осуществлено последовательным действием *n*-нитробензальдоксима, насыщенного при 0°С раствора аммиака в метаноле и 0,5 *n*. водного NaOH при 60°С в течение 75 мин. 5'-Монофосфат (2'-5')(3'dA)₃ [(2'-5')p·(3'dA)₃] (XXII) был выделен в индивидуальном виде с помощью хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (НСО₃⁻-форма) с выходом 12%. С препаративной точки зрения выбранная стратегия синтеза 3'-дезоксаденозиновых олигомеров (XIX), (XX) и (XXII) менее эффективна в сравнении с описанной выше для соответствующих аденозиновых соединений. Умеренные выходы на стадиях конденсации и полного удаления защитных групп в случае 3'-дезоксадепозинового соединения представляются неожиданными, так как ранее на примере родственных соединений была показана высокая эффективность этого подхода [13]. Снижение выходов на стадиях конденсации связано с образованием заметных количеств 5'-О-хинолинсульфонатов (ср. с данными работы [24]). Вместе с тем на ряде других примеров было показано, что *n*-нитрофенилэтильная группа в качестве защиты межнуклеотидной фосфодиэфирной связи обладает существенными преимуществами в сравнении с 2-хлорфенильной и 2,5-дихлорфенильной группами [4, 2].

Строение синтезированных соединений было подтверждено данными ¹H-ЯМР, УФ и КД-спектроскопии, а их индивидуальность — с помощью

Эффект ионов цинка и типа акцептора на выход
5'-монофосфатов при микробиологическом
фосфорилировании клетками *Erw. herbicola* *

Акцептор	Концентрация ZnSO ₄	
	0	10 мкмоль/мл
Ado	50	65
3'dAdo	32	50
(2'-5')A ₂ (XV)	37	45
(2'-5')(3'dA) ₂ (XIX)	26	41
(2'-5')A ₃ (XVI)	28	38
(2'-5')(3'dA) ₃ (XX)	21	36

* Условия см. в «Экспер. части», концентрация NPP 30,4 мкмоль/мл, время инкубации 30 мин.

Таблица 2

Эффективность 5'-фосфорилирования различных субстратов
клетками *Erw. herbicola* в оптимальных условиях
(см. «Экспер. часть»)

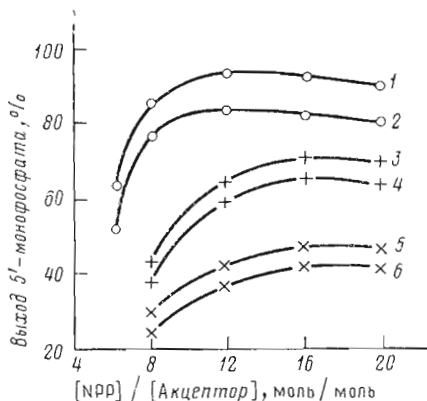
Акцептор	Оптимальное соотношение донора фосфатной группы и акцептора, моль/моль	Максимальный выход 5'-монофосфата, %	Время реакции, мин
Ado	10 : 1	92	60
3'dAdo	10 : 1	93	90
(2'-5')A ₂ (XV)	16 : 1	79	90
(2'-5')(3'dA) ₂ (XIX)	16 : 1	81	120
(2'-5')A ₃ (XVI)	16 : 1	61	150
(2'-5')(3'dA) ₃ (XX)	16 : 1	64	180

ТСХ. ¹H-ЯМР-спектры тримеров (XVI) и (XX) полностью соответствовали спектрам, описанным в работах [12, 25]. Характер кривых КД и величины молярной эллиптичности димеров (XV) и (XIX) и тримеров (XVI) и (XX) согласовывались с описанными в работах [25, 26]. Обработка 5'-монофосфатов (XVIII) и (XXII) щелочной фосфатазой давала с количественными выходами «коровые» тримеры (XVI) и (XX) соответственно. Соединения (XV), (XVI), (XIX) и (XX) были использованы в качестве субстратов микробиологического фосфорилирования.

Ранее на примере изучения микробиологической трансформации аденозина в 5'-АМР нами был отобран штамм *Erwinia herbicola* 47/3, который осуществлял синтез АМР из аденозина и *n*-нитрофенилфосфата (NPP) с наибольшей эффективностью [3]. Было найдено, что при использовании в качестве источника фермента интактных клеток *Erw. herbicola* 47/3 оптимальными с точки зрения активности фермента и скорости 5'-монофосфорилирования являются следующие условия реакции: величина pH реакционной среды 4,5, температура — 45–50° С, молярное соотношение аденозин/NPP — 1 : 8–10. В этих условиях не проявляется аденозиндезаминирующая активность и максимальный выход АМР достигается за минимальное время. Фосфорилирование синтезированных димеров и тримеров, а также 3'-дезоксаденозина было изучено в аналогичных условиях. Для сравнения приведены данные 5'-монофосфорилирования аденозина.

Известно, что некоторые ионы двухвалентных металлов ускоряют реакцию ферментативного фосфорилирования нуклеозидов при использовании в качестве источника фермента интактных клеток (см., например, [27, 28]). В случае изученного нами штамма *Erw. herbicola* фосфотрансферная активность существенно повышалась в присутствии ионов двухвалентного цинка, взятого в реакцию в виде сульфата, в концентрации 10 мМ (табл. 1). Этот факт вызвал необходимость изучить влияние соот-

Влияние соотношения субстратов на выход 5'-монофосфатов при фосфорилировании клетками *Erw. herbicola* с использованием в качестве акцепторов мономеров Ado (1), 3'dAdo (2), димеров (XV) (3) и (XIX) (4), тримеров (XVI) (5) и (XX) (6). Время инкубации 1 ч. Данные в каждой точке представляют собой усредненные величины трех экспериментов



ношения субстратов на выход 5'-монофосфатов в присутствии ионов двухвалентного цинка. Результаты представлены на рисунке. Было найдено, что оптимальное молярное соотношение донора фосфатной группы (NPP) и акцептора в случае нуклеозидов составляет 8–10:1 и существенно выше в случае димеров и тримеров (16:1).

На основании всех этих данных была изучена эффективность фосфорилирования вышеупомянутых субстратов в оптимальных условиях. Результаты этого исследования (табл. 2) свидетельствуют, что при переходе от нуклеозидов к димерам и, далее, к тримерам эффективность фосфотрансферной реакции существенно снижается. Кроме того, в случае 3'-дезоксаденозина и его (2'→5') олигомеров для достижения максимальных выходов соответствующих 5'-монофосфатов требуется большее время реакции в сравнении с аденозином и его (2'→5') олигомерами. По-видимому, 3'-гидроксильная группа участвует в связывании субстрата с ферментом и ее отсутствие ухудшает субстратную активность.

Ранее Юодкой было показано [28], что для трансформации аденозина и некоторых динуклеозид (3'→5') монофосфатов можно использовать ацетонированные клетки *Serratia marcescens* IFM F420. Время реакции в этом случае составляет 20 ч, выходы 5'-монофосфатов ~50%. Предлагаемый нами метод селективного 5'-фосфорилирования адениновых нуклеозидов и (2'→5') олигоаденилатов с использованием интактных клеток *Erw. herbicola* проще и эффективнее и может быть использован не только для получения 5'-нуклеозидмонофосфатов, но и для препаративного фосфорилирования (2'→5') олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ), КД-спектры — на спектрополяриметре J-20 (Jasco, Япония) для растворов соединений в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7. ТСХ проводили на пластинках силикагеля F1500 LS254 и целлюлозы F1440 LS254 (Schleicher und Schüll, ФРГ). Системы растворителей для ТСХ на силикагеле: хлороформ — метанол, 24:1 (А); хлороформ — метанол, 19:1 (Б); хлороформ — метанол, 9:1 (В); хлороформ — метанол, 4:1 (Г); *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 5:3:2 (Д); изопропиловый спирт — водный аммиак (25%) — вода, 5:1:3 (Е); для ТСХ на целлюлозе — системы растворителей Д и Е. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (ЧССР). Все операции, если не оговорено в тексте, проводились при комнатной температуре (~20°С). Растворы веществ в органических растворителях, которые получались в результате обработки реакционных смесей, сушили безводным сульфатом натрия.

3'-Дезоксиаденозин был получен согласно работе [29]. Синтез заведомого образца 3'dAMP-5' был осуществлен согласно работе [19]. Были использованы β-цианэтилфосфат (Ва-соль) производства «Союзреактив» и петролейный эфир с т. кип. 40–70°С.

Клетки *Erw. herbicola* выращивали глубинным культивированием в течение 18 ч при 28° С в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на круговой качалке (180 об/мин). Каждая колба содержала 50 мл мясопептонного бульона с 0,5% дрожжевым экстрактом. Биомассу собирали центрифугированием при 4500g в течение 10 мин, промывали 0,85% раствором NaCl и осадок повторно суспендировали в небольшом объеме того же раствора.

Для микробиологического фосфорилирования были использованы димеры и тримеры в виде триэтиламмониевых солей, индивидуальность которых была установлена с помощью ТСХ.

Реакционную смесь, содержащую (на 1 мл) 3,8 мкмоль акцептора, 20–80 мкмоль донора фосфатной группы NPP, 0,2 ммоль ацетатного буфера (рН 4,5), 10 мкмоль ZnSO₄ и 10 мг сухих клеток, инкубировали при 50° С в течение 30–180 мин. Объем реакционной смеси варьировался от 1 до 50 мл в зависимости от субстрата. После окончания инкубации реакционную смесь центрифугировали и надосадочную жидкость хроматографировали на пластинках Silufol UV 254 (Kavalier, ЧССР) первоначально в системе растворителей хлороформ–метанол, 4:1 (для удаления *n*-нитрофенола), затем в системе изопропиловый спирт–водный аммиак (25%)–вода, 7:1:2. В этих условиях соединения имели следующие значения R_f : Ado–0,57; AMP–0,15; 3'dAdo–0,66; 3'dAMP–0,18; (XV)–0,22; (XVII)–0,01; (XIX)–0,44; (XXI)–0,11; (XVI)–0,39; (XVIII)–0,0; (XX)–0,40; (XXII)–0,03. Вещества обнаруживали в УФ-свете, идентифицировали сравнением с известными образцами в случае AMP, 3'dAMP, соединений (XVIII) и (XXII) и по положению на хроматограмме пятен в случае соединений (XVII) и (XXI) и элюировали дистиллированной водой. Условия полного элюирования пятен с хроматограмм были найдены в экспериментах с известными соединениями. Концентрацию веществ и выход определяли спектрофотометрически, используя известные коэффициенты молярной экстинкции для AMP и (2'→5')олигоаденилатов [20, 30]. Выходы, приведенные на рисунке и в таблицах, представляют усредненные величины не менее трех экспериментов, при этом разброс не превышал ±2,5%.

Энзиматическое 5'-дефосфорилирование проводили с использованием щелочной фосфатазы из стенок кишок телят (Boehringer, ФРГ). К раствору 3–5 ОЕ₂₆₀ субстрата в 100 мкл воды добавляли 10 мкл раствора фермента, полученного разбавлением 10 мкл коммерческой фосфатазы 0,1 М раствором трис-HCl (рН 9,0) до 100 мкл, реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С и анализировали с помощью ТСХ. В течение указанного времени происходило полное 5'-дефосфорилирование всех изученных димеров и тримеров с образованием соответствующих «коровых» соединений.

6-*N*,2'-*O*,3'-*O*-Трибензоиладенозин (IV). К 1,0 г (1,17 ммоль) соединения (III) добавили 50 мл 5% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен–метанол, 7:3, и выдержали реакционную смесь 15 мин, затем разбавили ее хлороформом (100 мл) и промыли фосфатным буфером (рН 7; 3×50 мл). Водный слой экстрагировали хлороформом (2×50 мл), объединенные органические растворы высушили и упарили досуха. Остаток растворили в 10 мл хлороформа и при перемешивании добавили к 300 мл петroleйного эфира. Выпавший осадок отфильтровали, высушили. Получили 0,6 г (88%) бензоата (IV) в виде аморфного порошка, т. пл. 117–119° С (этанол), R_f 0,40 (А). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$ (MeOH), nm (lg ϵ): 280 (4,338), 230 (4,527). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.; J, Гц): 9,72 (уш. с, 1H, NH), 8,91 (с, 1H) и 8,40 (с, 1H, 8-H, 2-H), 8,16–7,33 (м, 15H, 3×C₆H₅CO), 6,45 (с, 1H, 1'-H), 6,36 (д, 1H, 2'-H, $J_{2',3'}$ 6,0), 6,04 (д, 1H, 3'-H, $J_{3',4'}$ 5,0), 4,48 (м, 1H, 4'-H), 3,94 (м, 2H, 5'-H, 5''-H).

Аденилил (2'→5')аденозин (XV), аденилил (2'→5')аденилил (2'→5')аденозин (XVI) и его 5'-монофосфат (XVIII). Аналогично описанному в работе [2] в результате реакции фосфодиэфира (I) и нуклеозида (IV) в присутствии хинолин-8-сульфохлорида и 3-нитро-1,2,4-триазола в абсолюте было получено соединение (VI), деблокирование которого давало димер (XV) с суммарным выходом 72%, R_f 0,33 (Е).

Исходя из димера (VI) и фосфодиэфира (I) было получено [2] соединение (VII), деблокирование которого приводило к тримеру (XVI) с суммарным выходом 49% на исходный трибензоат (IV), R_f 0,16 (целлюлоза, Д), 0,56 (целлюлоза, Е). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм ($\lg \epsilon$): 260 (4,56). КД-спектр, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 267 (+55,5), 254 (0), 245 (-23,0), 236 (0), 225 пл., 218 (+40,2), 208 (0).

К 0,25 г (0,11 ммоль) тримера (VII) добавили 11 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен — метанол, 7 : 3, и выдержали реакционную смесь 20 мин, затем разбавили ее хлороформом до 80 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×40 мл). Водный слой экстрагировали хлороформом (20 мл), объединенные органические растворы высушили и упарили досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (40 см³), продукты элюировали хлороформом. Получили 0,18 г (81,4%) детритилированного тринуклеозиддифосфата (IX) в виде твердой пены, R_f 0,58 (А).

К 0,1 г (0,0485 ммоль) соединения (IX) добавили при 0° С смесь 0,053 мл (88,5 мг, 0,576 ммоль) хлорокиси фосфора и 0,336 мл (403,2 мг, 2,88 ммоль) триметилфосфата и реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° С, затем вылили при перемешивании в 100 мл безводного эфира. Эфирный раствор декантировали, к остатку добавили 10 мл смеси пиридин — вода, 4 : 1, реакционную смесь выдержали 1 ч, затем упарили досуха, добавили 5 мл абс. пиридина и снова упарили. Остаток обработали 0,5 М раствором DBU в абс. пиридине (10 мл) в течение 20 ч, добавили 5 мл 1 М раствора уксусной кислоты в пиридине, раствор упарили и остаток упарили с пиридином (2×10 мл). Остаток растворили в 20 мл концентрированного водного аммиака, реакционную смесь выдержали 20 ч, упарили, остаток растворили в 100 мл 0,001 М ТЕАВ, нанесли на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻-форма, 50 см³), элюировали ТЕАВ (градиент концентраций 0,001→1 М, 2×200 мл). Получили 39,5 мг (52,4%) тринуклеозидтрифосфата (XVIII) в виде тетра(триэтиламмониевой) соли, R_f 0,34 (целлюлоза, Е). УФ-спектр, λ_{\max} (H₂O), нм ($\lg \epsilon$): 260 (4,54). КД-спектр, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 269 (+76,6), 253 (0), 245 (-36,0), 237 (0), 220 (+40,5), 208 (0).

3'-Дезоксиаденилил (*2'*→*5'*)-*3'*-дезоксаденозин (XIX), *3'*-дезоксаденилил (*2'*→*5'*)-*3'*-дезоксаденилил (*2'*→*5'*)-*3'*-дезоксаденозин (XX) и его *5'*-монофосфат (XXI). К смеси 0,31 г (0,337 ммоль) фосфодиэфира (II) и 0,15 г (0,266 ммоль) нуклеозида (V) в 3 мл абс. пиридина добавили 0,19 г (1,66 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола и после его растворения 0,13 г (0,55 ммоль) хинолин-8-сульфохлаорида. Реакционную смесь перемешивали 24 ч, затем разбавили до 50 мл хлороформом, промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×30 мл) до нейтральной реакции промывных вод, высушили, упарили, остаток упарили с толуолом (2×15 мл). Остаток нанесли на колонку с силикагелем (70 см³), продукты элюировали хлороформом (300 мл), затем метанолом в хлороформе (линейный градиент 0→3 об.%, общий объем 500 мл). Фракции, содержащие соединение (X), упарили до объема 3 мл и добавили к 200 мл петroleйного эфира. Осадок отфильтровали, высушили. Получили 0,26 г (71%) триэфира (X), R_f 0,77 (А). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм ($\lg \epsilon$): 231 (4,67), 279 (4,50).

Раствор 0,1 г (0,0733 ммоль) димера (X) в 10 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен — метанол, 7 : 3, выдержали 6 мин, реакционную смесь разбавили хлороформом до 50 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 3×20 мл). Органический слой отделили, высушили и упарили досуха. К остатку добавили по 1,5 мл диоксана, триэтиламина и воды, 80 мг (0,48 ммоль) *n*-нитробензальдоксима и выдержали смесь 20 ч. К реакционной смеси добавили 10 мл пиридина, упарили досуха, остаток упарили с пиридином (2×10 мл) и растворили в 15 мл насыщенного при 0° С раствора аммиака в метаноле. Раствор выдержали 16 ч и упарили, остаток хроматографировали на колонке (50 см³) с DEAE-сефадексом А-25 (НСС₃⁻-форма), элюировали ТЕАВ (линейный градиент концентраций 0,001→0,6 М). Получили 20 мг (41%) соединения (XIX) в виде триэтиламмониевой соли, R_f 0,77 (Е). УФ-спектр, λ_{\max} (H₂O),

пм ($\lg \epsilon$): 260 (4,413). КД-спектр, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 267 (+57,2), 256 (0), 247 (-46,6), 229 пл. (0), 217 (+21,2), 210 (0).

Раствор 0,45 г (0,33 ммоль) димера (X) в 45 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол, 7:3, выдержали 6 мин, затем реакционную смесь разбавили дихлорэтаном до 100 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×20 мл) и водой. Объединенные водные экстракты промыли хлороформом (3×15 мл). Объединенные органические растворы высушили, упарили до объема 7 мл и при перемешивании добавили к 250 мл гексана. Выпавший осадок отфильтровали, высушили. Получили 0,295 г (82%) детритилированного соединения (XII) в виде аморфного порошка, R_f 0,43 (Б). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$ (MeOH), нм ($\lg \epsilon$): 279 (4,668), 235 пл. (4,73).

Смесь 0,243 г (0,264 ммоль) диэфира (II) и 0,24 г (0,22 ммоль) димера (XII) в 2,5 мл абс. пиридина конденсировали в присутствии 0,15 г (1,32 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола и 0,1 г (0,44 ммоль) хинолин-8-сульфохлорида аналогично описанному в синтезе димера (X). Получили 0,275 г (66%) маслообразного тримера (XI), R_f 0,81 (Б).

Раствор 0,18 г (0,095 ммоль) тримера (XI) в 20 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол, 7:3, выдержали 6 мин и реакционную смесь обработали аналогично описанному в синтезе соединения (XII). Остаток после упаривания объединенных органических растворов панесли на колонку с силикагелем (60 см³), продукты элюировали хлороформом (200 мл), затем метанолом в хлороформе (линейный градиент 0→2 об.%, общий объем 500 мл). Фракции, содержащие соединение (XIII), объединили и упарили досуха. Получили 0,12 г (78%) соединения (XIII), R_f 0,58 (Б).

В результате дальнейшего деблокирования 0,12 г (0,074 ммоль) соединения (XIII), как описано в синтезе димера (XIX), получили 0,04 г (50%) тримера (XX), R_f 0,24 (Е), 0,15 (целлюлоза, Д). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$ (H₂O), нм ($\lg \epsilon$): 260 (4,53). КД-спектр, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 265 (+61,5), 251 (0), 243 (-36,5), 227 пл. (0), 217 (+19,2), 210 (0).

К раствору 0,02 г (0,086 ммоль) свежеприготовленной пиридиновой соли β -цианэтилфосфата [22] в 1 мл абс. пиридина добавили 0,052 г (0,173 ммоль) триизопропилбензолсульфохлорида в 0,4 мл абс. пиридина, реакционную смесь перемешивали 30 мин, затем добавили 0,07 г (0,043 ммоль) соединения (XIII) в 0,3 мл абс. пиридина. Реакционную смесь перемешивали без доступа влаги 24 ч, затем добавили 0,03 г триизопропилбензолсульфохлорида, перемешивали еще 4 ч, вылили в 100 мл фосфатного буфера (рН 7) со льдом, перемешивали 90 мин и экстрагировали хлороформом (4×40 мл). Объединенные хлороформные экстракты высушили, упарили, после чего хроматографировали на силикагеле (50 см³), продукты реакции элюировали хлороформом (100 мл), затем смесью хлороформ — метанол — триэтиламин (линейный градиент от 98:4:2 до 90:10:2, общий объем 300 мл). Получили 0,075 г (93%) соединения (XIV) в виде масла, R_f 0,38 (Г).

К 0,075 г (0,04 ммоль) соединения (XIV) добавили 0,08 г (0,48 ммоль) *n*-нитробензальдоксима в 4,5 мл смеси диоксан — триэтиламин — вода, 1:1:1, реакционную смесь выдержали 16 ч, упарили, добавили 5 мл пиридина и снова упарили (эту операцию повторили трижды). К остатку добавили 20 мл насыщенного при 0°С раствора аммиака в метаноле, раствор выдержали 20 ч и упарили, а остаток обработали 4 мл 0,5 н. раствора NaOH при 60°С в течение 75 мин. Реакционную смесь разбавили водой до 25 мл и нейтрализовали ионообменной смолой дауэкс 50W×12 (H⁺-форма). Смолу отфильтровали, промыли водой, остаток хроматографировали на колонке (30 см³) с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻-форма), элюировали TEAB (градиент концентраций 0,001→0,8 М; общий объем 700 мл). Получили 6,5 мг фосфата (XXII), R_f 0,20 (целлюлоза, Е). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$ (H₂O), нм ($\lg \epsilon$): 260 (4,53). КД-спектр, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 265 (+60,4), 253 (0), 244 (-31,6), 224—213 пл. (0).

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Немецкому исследовательскому обществу (г. Бонн, ФРГ) и Фонду им. А. фон

Гумбольдта (г. Бонн — Бад-Годесберг, ФРГ) за частичную финансовую поддержку настоящего исследования. Авторы благодарны проф. В. Пфляйдереру (Университет г. Констанц, ФРГ) за внимание к их работе и помощь в ее проведении. Авторы благодарны Г. С. Янковской за запись КД-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Квасюк Е. И., Кулак Т. И., Калининко Е. Н., Подкопаева Т. Л., Михайлопуло И. А., Пфляйдерер В. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1227—1238.
2. Kvasyuk E. I., Kulak T. I., Khrirach N. B., Mikhailopulo I. A., Uhlmann E., Charubala R., Pfeleiderer W. Nucleosides and Nucleotides, 1985, in press.
3. Попов И. Л., Барай В. Н., Зинченко А. И., Чернов С. П., Квасюк Е. И., Михайлопуло И. А. Антибиотики, мед. биотехнология, 1985, т. 30, № 8.
4. Eppstein D. A., Marsh Y. V., Schryver B. B., Larsen M. A., Barnett J. W., Verheyden J. P. H., Priske E. J. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 22, p. 13390—13397.
5. Sawai H., Imai J., Lesiak K., Johnston M. I., Torrence P. F. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 3, p. 1671—1677.
6. Jones S. S., Reese C. B. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 24, p. 7399—7401.
7. Ikehara M., Oshie K., Ohtsuka E. Tetrahedron Lett., 1979, № 38, p. 3677—3680.
8. Sawai H., Shibata T., Ohto M. Tetrahedron, 1981, v. 37, № 3, p. 481—485.
9. Hartog den J. A. J., Wijnands R. A., Boom van J. H. J. Org. Chem., 1981, v. 46, № 11, p. 2242—2251.
10. Imai J., Torrence P. F. J. Org. Chem., 1981, v. 46, № 20, p. 4015—4021.
11. Ohtsuka E., Yamane A., Ikehara M. Chem. Pharm. Bull., 1982, v. 30, № 1, p. 376—378.
12. Martin E. M., Birdsall N. J. M., Brown R. E., Kerr I. M. Eur. J. Biochem., 1979, v. 95, № 2, p. 295—307.
13. Квасюк Е. И., Кулак Т. И., Зайцева Г. В., Михайлопуло И. А., Пфляйдерер В. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 4, с. 506—514.
14. Charubala R., Pfeleiderer W. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 46, p. 4789—4792.
15. Takaku H., Yamaguchi R., Nomoto T., Hata T. Tetrahedron Lett., 1979, v. 20, № 40, p. 3857—3861.
16. Kvasyuk E. I., Kulak T. I., Zaitseva G. V., Mikhailopulo I. A., Charubala R., Pfeleiderer W. Tetrahedron Lett., 1984, v. 25, № 34, p. 3683—3686.
17. Uhlmann E., Pfeleiderer W. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 13, p. 1181—1184.
18. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. Tetrahedron Lett., 1967, № 50, p. 5065—5068.
19. Mikhailopulo I. A., Cramer F. FEBS Lett., 1982, v. 144, № 1, p. 109—111.
20. Charubala R., Pfeleiderer W. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 42, p. 4077—4080.
21. Reese C. B., Titmas R. C., Yau L. Tetrahedron Lett., 1978, № 30, p. 2727—2730.
22. Tener G. M. J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 1, p. 159—168.
23. Lohrmann R., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 4, p. 829—833.
24. Takaku H., Kono T. Chem. Pharm. Bull., 1982, v. 30, № 8, p. 2991—2995.
25. Doornbos J., Charubala R., Pfeleiderer W., Allona C. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 3, p. 4569—4582.
26. Markham A. F., Porter R. A., Gait M. J., Sheppard R. C., Kerr I. M. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 7, p. 2569—2582.
27. Chao H. M. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 8, p. 2330—2333.
28. Юодка Б. А. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 10, с. 1434—1440.
29. Ахрем А. А., Зайцева Г. В., Калининко Е. Н., Михайлопуло И. А. Биорган. химия, 1976, т. 2, № 10, с. 1325—1337.
30. Charubala R., Pfeleiderer W. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 20, p. 1933—1936.

Поступила в редакцию
18.11.1985

CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL 5'-PHOSPHORYLATION OF (2'→5') OLIGOADENYLATES

KVASYUK E. I., KALINICHENKO E. N., KULAK T. I., PODKOPAEVA T. L.,
MIKHAILOPULO I. A., POPOV I. L.*, BARAI V. N.*, ZINCHENKO A. I.* -

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the
Byelorussian SSR, Minsk; *Institute of Microbiology, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

Chemical and microbiological 5'-phosphorylation of (2'→5') oligoadenylates was studied. The (2'→5') trimer of adenylic acid and its 3'-deoxy analogue with selectively deblocked 5'-hydroxyl groups were used as substrates for chemical phosphorylation with phosphorus oxychloride, pyrophosphoryl chloride or 2-cyanoethyl phosphate. The corresponding 5'-monophosphates were obtained after removal of the blocking groups. The same 5'-monophosphates were prepared by phosphorylation of «core» trimers — A2'p5'A2'p5'A and its 3'-deoxy analogue using intact cells of *Erwinia herbicola* 47/3 and *p*-nitrophenyl phosphate as a phosphate donor. The phosphotransferase reaction efficiency decreased markedly on passing from monomers to (2'→5') dimers and then to (2'→5') trimers. The 3'-deoxy compounds turned out to be poorer substrates in comparison with adenosine and its (2'→5') oligomers.