



УДК 577.113'4:615.779.925:543.422.25

## СТРУКТУРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО БЛЕОМИЦИНА А<sub>5</sub> ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ <sup>13</sup>С-ЯМР

© 1996 г. Д. С. Сергеев, А. Ю. Денисов, В. Ф. Зарытова\*

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8*

Поступила в редакцию 23.05.95 г.

Установлена локализация ковалентной связи, образующейся при синтезе конъюгатов противоопухолевого антибиотика блеомицина А<sub>5</sub> и олигонуклеотидов. Для этой цели было синтезировано и методом <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии исследовано модельное соединение – блеомициновое производное уридин-5'-фосфата. Показано, что фосфатная группа нуклеотида образует фосфамидную связь с первичной аминогруппой остатка спермидина антибиотика. Образование Р-Н-связи приводит к сдвигу в слабое поле на 1.8 и 4.2 м. д. сигналов ближайших атомов углерода и расщеплению с J 6.8 Гц сигнала атома углерода благодаря вицинальному спин-спиновому взаимодействию с атомом фосфора.

*Ключевые слова:* <sup>13</sup>С-ЯМР; блеомицин, производное уридин-5'-фосфата; олигонуклеотиды.

В последнее десятилетие синтезировано большое число различных производных олигонуклеотидов с целью использования их для сайт-специфического воздействия на нуклеиновые кислоты и создания на их основе высокоселективных терапевтических препаратов [1]. Блеомициновые производные олигонуклеотидов имеют в этом отношении ряд преимуществ. Во-первых, входящий в их состав блеомицин является противоопухолевым антибиотиком, который действует на нуклеиновые кислоты и используется в медицине. Во-вторых, из известных к настоящему времени реакционноспособных производных олигонуклеотидов блеомициновые производные наиболее эффективны, способны каталитически расщеплять одноцепочечную ДНК [2]. Указанные свойства позволяют отнести блеомициновые производные олигонуклеотидов к числу перспективных противовирусных и противораковых препаратов. Отсутствие данных, на основании которых можно было бы однозначно установить структуру блеомициновых производных, препятствует широкому применению этих соединений и пониманию процессов, происходящих с их участием.

Ранее [3] нами был разработан метод ковалентного присоединения блеомицина А<sub>5</sub> (I) к концевой фосфатной группе олигонуклеотидов и показано, что при этом образуется фосфамидная связь с участием спермидиновой части молекулы антибиотика. Однако не удалось выяснить, является ли полученный конъюгат смесью веществ или индивидуальным соединением и какой из азо-

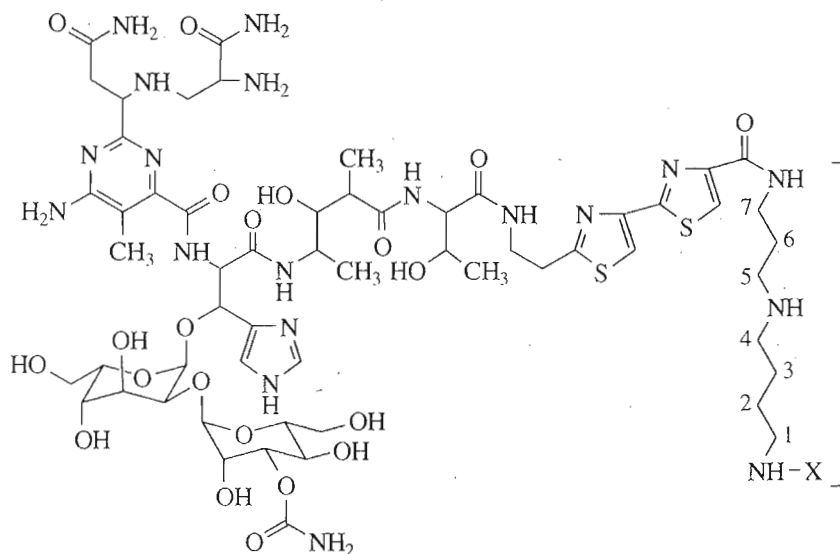
тов спермидинового остатка участвует в реакции. В то же время именно место присоединения фосфатной группы олигонуклеотида к блеомицину должно определять подвижность остатка антибиотика при образовании олигонуклеотидным реагентом с ДНК-мишенью уотсон-криковского или хугстиновского комплекса.

В данной работе с использованием метода спектроскопии <sup>13</sup>С-ЯМР однозначно установлена структура блеомициновых производных олигонуклеотидов. Показано, что ковалентная связь образуется между первичной аминогруппой спермидиновой части антибиотика и концевым фосфатом олигонуклеотида.

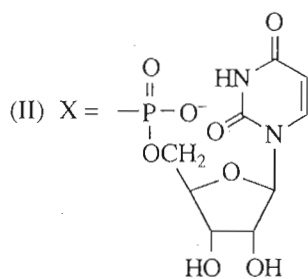
Работа выполнена с использованием модельного соединения (II), где вместо олигонуклеотида с целью упрощения системы использовали 5'-мононуклеотид (уридин-5'-фосфат). Такое упрощение допустимо, так как ранее было установлено, что межнуклеотидные фосфатные группы не принимают участия в реакции с антибиотиком [3]. Кроме того, был получен фосфамид уридин-5'-фосфата (IV), где в реакции с фосфатом заведомо участвовала первичная аминогруппа 1,4-диаминобутана (III). Синтез модельных соединений был осуществлен по методике, используемой для синтеза блеомициновых производных олигонуклеотидов [3].

Для соединений (I) - (IV) проанализированы спектры <sup>13</sup>С-ЯМР, записанные в режиме J-модуляции спинового эха (рисунок). Отнесение сигналов блеомицина А<sub>5</sub> проведено на основании литературных данных [4 - 6]. Химические сдвиги <sup>13</sup>С

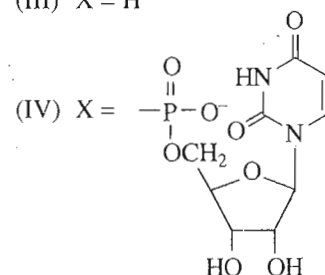
\* Автор для переписки.



(I) X = H



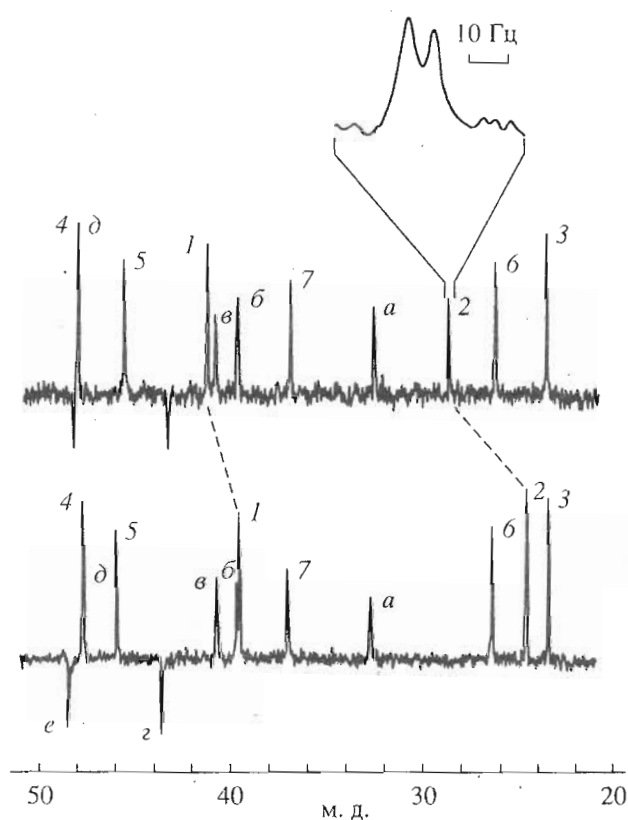
(III) X = H



основной части молекулы, не включающей в себя остаток спермидина, хорошо коррелируют с данными для блеомицина A<sub>2</sub> [4, 5]. Сигналы углеродных атомов спермидинового остатка блеомицина A<sub>5</sub> совпадают с сигналами аналогичных атомов антибиотика блеомицинового ряда – таллизомидина В [6]. Присоединение уридин-5'-фосфата к блеомицину A<sub>5</sub> практически не влияет на химические сдвиги <sup>13</sup>C основной части молекулы антибиотика (рисунок, сигналы а - е), однако приводит к сильному сдвигу в слабое поле сигналов С-1- и С-2-атомов спермидиновой части на 1.8 и 4.2 м. д. соответственно (таблица). Кроме того, сигнал С-2 в спектре соединения (II) представлен в виде дублета с <sup>3</sup>J<sub>C-2, P</sub> 6.8 Гц вследствие спин-спинового

взаимодействия С-2 с атомом фосфора (рисунок). В то же время расщепление сигнала С-1 практически не наблюдается.

В связи с отсутствием в литературе данных о влиянии фосфамидной группы на химические сдвиги <sup>13</sup>C и расщеплении сигналов для близлежащих атомов углерода мы дополнительно изучили поведение сигналов <sup>13</sup>C 1,4-диаминобутана при присоединении к нему уридин-5'-фосфата. Приведенные в таблице данные для соединения (IV) полностью совпадают с описанными выше для соединения (II). При этом величины расщепления углеродных сигналов в молекуле (IV) идентичны представленным для соединения (II). Изменения



Фрагменты  $^{13}\text{C}$ -ЯМР  $J$ -модулированных спектров блеомицина  $\text{A}_5$  (I) и его нуклеотидного производного (II). Условия записи спектров даны в подписи к таблице. Цифровая нумерация сигналов соответствует нумерации углеродных атомов спермидинового остатка. Сигналы  $a - e$  относятся к атомам углерода молекулы антибиотика, не включающей остаток спермидина [4, 5].

химических сдвигов  $^{13}\text{C}$ , вероятно, в большей степени определяются изменением степени протонирования аминогруппы, нежели влиянием самой фосфатной группы в качестве заместителя. Так, переход от  $\text{NH}_3^+$ - к  $\text{NH}_2$ -заместителю сдвигает сигналы  $\alpha$ - и  $\beta$ -атомов углерода насыщенной али-

фатической цепи в слабое поле на 2 и 4 м. д. соответственно [7]. Учитывая, что концевые аминогруппы в соединениях (I) и (III) протонированы в воде при нейтральных pH, присоединение фосфатной группы, вероятно, приводит в целом к нейтральному состоянию атомов азота фосфамидной группы.

Сигналы  $^{13}\text{C}$ -ЯМР уридиновой части соединений (II) и (IV) соответствуют литературным данным [7], при этом наблюдается расщепление сигнала C-5' рибозного кольца (64.3 м. д.) с  $J$  4.8 Гц и сигнала C-4' (84.2 м. д.) с  $J$  8.8 Гц.

В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР соединения (II) зарегистрированы сигналы протонов нуклеотидной части и антибиотика. Протоны блеомициновой части молекулы дают сигналы со следующими химическими сдвигами: 7.27 и 7.81 (протоны имидазольного остатка), 7.99 и 8.17 м. д. (протоны битиазольного остатка). Химические сдвиги сигналов протонов нуклеотидной части: 5.86 (H-5 урацила), 5.90 (H-1' рибозы), 7.92 м. д. (H-6 урацила). При этом отношении интегральных интенсивностей сигналов протонов блеомицина и нуклеотида близко к 1, что подтверждает присоединение одной молекулы уридин-5'-фосфата к одной молекуле антибиотика.

Электронный спектр поглощения блеомицинового производного уридин-5'-фосфата (II) фактически не отличается от суперпозиции спектров нуклеотида и антибиотика (данные не приведены).

Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР соединения (II) представляет собой единственный сигнал, сдвинутый в слабое поле на 8.7 м. д. относительно сигнала 85% ортофосфорной кислоты. Данная область спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР характерна для сигналов атомов фосфора фосфомоноэфиров, образующих фосфамидную связь с алифатической аминогруппой [8].

Совокупность данных убедительно доказывает, что присоединение нуклеотида происходит по концевой (первичной) аминогруппе спермидиновой части блеомицина  $\text{A}_5$ .

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) спермидиновых углеродных атомов спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединений (I) - (IV)

Соединение	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7
(I)	39.6	24.7	23.5	47.7	45.9	26.5	37.2
(II)	41.4*	28.9*	23.8	48.1	45.7	26.5	37.2
(III)	39.6	24.7	24.7	39.6			
(IV)	41.4*	28.8*	25.0	40.0			

\* Константы  $^3J_{\text{C-2,P}} = 6.8 \pm 0.3$  и  $^2J_{\text{C-1,P}} < 2$  Гц.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры <sup>13</sup>C- и <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (I) - (IV) записывали на спектрометре AM-400 (Bruker, Германия) при 20°C. Образцы в концентрации 5 мМ в буферном растворе 0.2 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 6.5) в D<sub>2</sub>O помещали в 5-мм ампулу. Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР (100.61 МГц) записывали в режиме J-модуляции спинового эха с настройкой на <sup>1</sup>J<sub>C,H</sub> 135 Гц. Количество накоплений в спектре достигало 3 × 10<sup>4</sup>. В качестве внешнего стандарта использовали 1,4-диоксан (δ<sub>C</sub> 67.4 м. д.). Химические сдвиги сигналов протона в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР (400.13 МГц) рассчитаны относительно сигнала воды (4.80 м. д.). Отнесение сигналов протонов соединения (II) проводили только в области спектра от 5.5 до 8.2 м. д.

Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР соединения (II) записывали на спектрометре AC-200 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 81.01 МГц. Запись спектров осуществляли при 25°C в 5-мм ампуле с концентрацией образца 5 мМ в буферном растворе 0.01 М NaHCO<sub>3</sub> (рН 8.5) в D<sub>2</sub>O. Химический сдвиг определяли относительно 85% ортофосфорной кислоты.

Электронные сдвиги поглощения записывали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия) в буферном растворе 0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl (рН 7.5) при 20°C.

Работа выполнена при поддержке ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" и программы комитета РФ по высшему образованию "Фундаментальные исследования в области химических технологий".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. // Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1994.
2. Сергеев Д.С., Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 695 - 702.
3. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Сергеев Д.С. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1193 - 1200.
4. Akkerman M.A.J., Haasnoot C.A.G., Pandit U.K., Hilbers C.W. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26. P. 793 - 802.
5. Naganawa H., Muraoka Y., Takita T., Umezawa H. // J. Antibiot. 1977. V. 30. P. 388 - 396.
6. Greenaway F.T., Dabrowiak J.C., Grulich R., Crooke S.T. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 270 - 273.
7. Kalinowski H.O., Berger S., Braun S. // Carbon <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. Chichester: John Wiley, 1988.
8. Лебедев А.В., Резвухин А.И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 149 - 185.

## Structure Elucidation of an Oligonucleotide Derivative of Bleomycin A<sub>5</sub> by <sup>13</sup>C NMR

D. S. Sergeev, A. Yu. Denisov, and V. F. Zarytova<sup>1</sup>

*Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Division,  
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

**Abstract**—The localization of the covalent bond in the conjugates of bleomycin A<sub>5</sub> and oligonucleotides was established by <sup>13</sup>C NMR using the bleomycin derivative of uridine-5'-phosphate synthesized as a model compound. The phosphate group of the nucleotide was shown to form a phosphamide bond with the primary amino group of the spermidine moiety of bleomycin A<sub>5</sub>. The formation of the P-N bond causes the downfield shift of the signals of the neighboring carbon atoms of the spermidine fragment by 1.8 and 4.2 ppm and the splitting of the signal of the C-2 atom of the spermidine fragment with J 6.8 Hz due to vicinal spin-spin coupling with the phosphorous atom.

*Key words:* <sup>13</sup>C NMR; bleomycin, uridine-5'-phosphate derivative; oligonucleotides.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.