



УДК 547.952/953.057:547.963.32.057

## СИНТЕЗ ЦЕРАМИДФОСФОТИМИДИНА КАК МОДЕЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ В СИНТЕЗЕ СФИНГОФОСФОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1996 г. О. В. Осколкова<sup>#</sup>, А. Ю. Замятина, В. И. Швец,  
Д. С. Есипов\*, В. Г. Коробко\*

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 31.08.95 г. После доработки 15.11.95 г.

Амидофосфитным и Н-фосфонатным методом в растворе и на твердой фазе осуществлен синтез церамидфосфотимидина как модельного соединения для получения нуклеотидов с присоединенным по 5'-концу сфингофосфолипидным остатком. Показано, что диастереомеры церамидфосфотимидина, содержащие остатки *D*- и *L*-эритро-сфинганинов, могут быть разделены с помощью адсорбционной ВЭЖХ.

*Ключевые слова:* церамидфосфотимидин, нуклеозиды, модифицированные нуклеотиды, фосфиттриэфирный метод, Н-фосфонатный метод, сфингофосфолипиды.

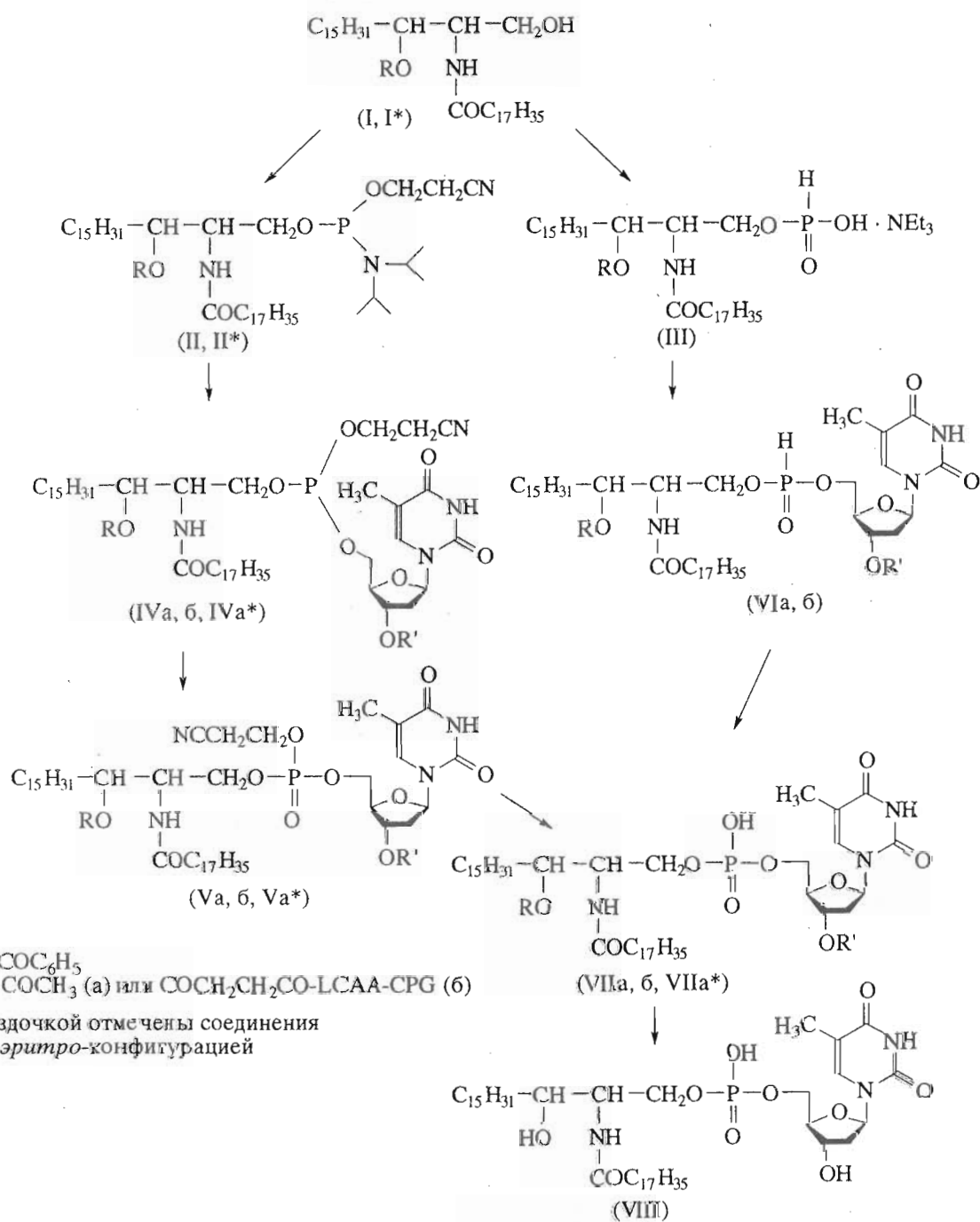
Увеличение способности синтетических биологически активных веществ проникать внутрь клетки через клеточную мембрану – ключевая проблема современной биохимии и медицины. Один из вариантов решения этой проблемы для нуклеозидов и фрагментов нуклеиновых кислот заключается в присоединении к ним различных гидрофобных якорных групп. Так, высокий противоопухолевый терапевтический эффект показан для конъюгатов диацилглицерофосфолипидов с нуклеозидами [1–3]. Для их получения применялись не только химические, но и энзиматические методы [4]. Производные нуклеозидов с гидрофобными остатками являются модельными соединениями для изучения трансмембранного транспорта [5, 6]. Фосфолипидные производные азидотимидина испытывались на антиретровирусную активность [7]. Для увеличения способности олигонуклеотидов проникать внутрь клетки, как правило, использовали ковалентно связанные остатки холестерина [8–10], высших жирных спиртов [11], фосфолипидов [12]. Такие соединения изучались как потенциальные антивирусные и противоопу-

холевые средства. Преимущество фосфолипидных производных заключается в повышенном сродстве якорных групп к биологическим мембранам. Кроме того, предполагается, что липидная часть защитит олигонуклеотид от гидролиза внутриклеточными нуклеазами. Не исключена также возможность расщепления липолитическими ферментами фосфодиэфирной связи, соединяющей липид и олигонуклеотид, и высвобождение последнего внутрь клетки.

Цель нашей работы – выбор метода и подбор условий для синтеза липоолигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце в качестве липофильной части остаток церамида (*rac*-*N*-стеароилсфинганина), связанный с нуклеотидным компонентом фосфодиэфирной связью. В последнее время в химии фосфолипидов широко применяются производные трехвалентного фосфора – амидофосфиты и Н-фосфонаты [13–17], однако для их использования в твердофазном олигонуклеотидном синтезе необходима адаптация растворителей и активирующих агентов к гидрофобным соединениям. В качестве липидной части мы выбрали *D,L*-эритро-*N*-стеароилсфинганин – один из компонентов фосфолипидов биологических мембран. Сфинганин, имеющий первичную и вторичную гидроксильные группы, позволяет формировать фосфодиэфирные связи и при необходимости может быть включен в любое положение олигонуклеотидной цепи. Аминофункция сфинголипидов

Сокращения: DCA – дихлоруксусная кислота, THF – тетрагидрофуран, TEA – триэтиламин, DMТг – 4,4'-диметокситриил, MeCN – ацетонитрил, Py – пиридин, Sph – сфинганин, St – стеароил, TPSCI – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, Thd – тимидин, LCAA-CPG – пористое стекло с аминоалкильными группами.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



## Схема.

дает возможность вводить различные репортерные группы, связанные с гидрофобной частью гибридной молекулы.

В настоящей работе мы представляем синтез церамидфосфотимидина (VIII) — модельного соединения для последующего синтеза липоолигонуклеотидов. На схеме показаны два возможных подхода к получению конъюгатов с церамидным остатком. Церамидфосфотимидин (VIII) был получен из *D,L*-эритро-3-О-бензоилцерамида (I)

как амидофосфитным, так и Н-фосфонатным способом. Синтез целевого соединения был реализован в растворе ( $\text{R}' = -\text{COCH}_3$ ) и на твердой фазе ( $\text{R}' = -\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-LCAA-CPG}$ ).

Для реализации амидофосфитного метода в растворе сначала был получен амидофосфит (II) из *D,L*-эритро-3-О-бензоилцерамида (I) реакцией с бис(Н,Н-диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфином в присутствии диизопропиламмонийтетразолида. Конденсацию амидофосфита (II) с 3'-О-

ацетил-2'-дезокситимидином в растворе проводили в присутствии тетразола в смеси хлористый метилен-ацетонитрил. Промежуточный фосфит-триэфир (IVa) без выделения в индивидуальном состоянии окисляли *tert*-бутилгидропероксидом до фосфотриэфира (Va). После удаления триэтиламинол цианэтильной защитной группы получали частично защищенный керамидфосфотимидин (VIIa) с выходом 60%.

Н-Фосфонат (III) получали фосфитилированием 3-О-бензоилцерамида (I) трихлоридом фосфора в присутствии триазола и N-метилморфолина. Далее полученный фосфонат (III) вводили в реакцию с 3'-О-ацетилтимидином в присутствии 4-кратного молярного избытка TPSCI в качестве конденсирующего реагента в условиях синтеза фосфолипидов [16]. Окисление фосфитдиэфира (VIa) иодом в водно-пиридиновом растворе дало соединение (VIIa) с выходом 56%, а последующее удаление защитных групп метилатом натрия в метаноле привело к образованию фосфодиэфира (VIII).

Структура полученных соединений (VIIa, VIII) была подтверждена данными <sup>1</sup>H-ЯМР, <sup>31</sup>P-ЯМР, УФ-спектроскопии, ВЭЖХ, а также элементного анализа. Было установлено, что при адсорбционной ВЭЖХ керамидфосфотимидины (VIIa) и (VIII) выходили двумя пиками равной интенсивности с временем удерживания 16.73 и 17.49 мин для (VIIa) (рис. 1) и 20.04 и 20.80 мин для (VIII) (рис. 2). Два пика на хроматограммах могли соответствовать производным *D*- и *L*-эритро-изомеров сфинганина. Для проверки этого предположения мы осуществили синтез *D*-эритро-3-бензоилцерамидфосфотимидина (VIIa\*) по разработанной схеме. Необходимый для этого *D*-эритро-3-О-бензоилцерамид (I\*) был получен по методу [18]. Полученное соединение (VIIa\*) без выделения и предварительной очистки было проанализировано при помощи адсорбционной ВЭЖХ. Время выхода основного продукта совпало с временем выхода второго пика при хроматографии керамидфосфотимидина (VIIa). Чтобы убедиться в правильности полученного результата, мы провели хроматографию "смешанной пробы" неочищенного соединения (VIIa\*) и керамидфосфотимидина (VIIa), полученного из рацемического церамида (I) (рис. 3). Следует отметить, что обращенно-фазовая ВЭЖХ соединения (VIII) не привела к разделению смеси диастереомеров.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр соединения (VIIa) представляет собой наложение спектров двух диастереомеров, причем наибольшие отличия в химических сдвигах протонов двух соединений наблюдались для протона при шестом атоме углерода тимидина, метильной группы тимидина и двух CH<sub>2</sub>-групп алкильных цепей сфинганина. В <sup>31</sup>P-ЯМР-спектре

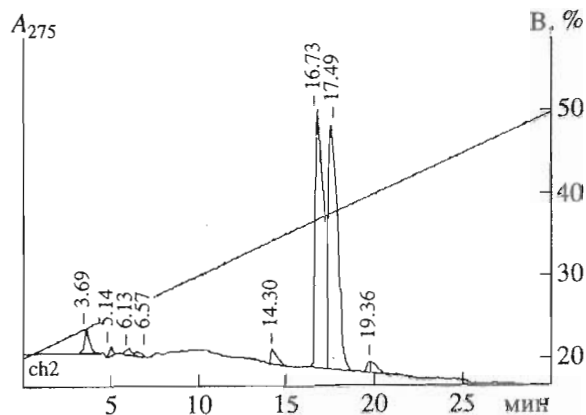


Рис. 1. Адсорбционная ВЭЖХ 5'-О-(*D,L*-эритро-3-бензоилцерамидфосфо)-3'-О-ацетилтимидина (VIIa) на колонке (250 × 4.6 мм) Zorbax Sil (Du Pont Instruments) в системе А с градиентом концентрации системы В от 20 до 50% за 30 мин.

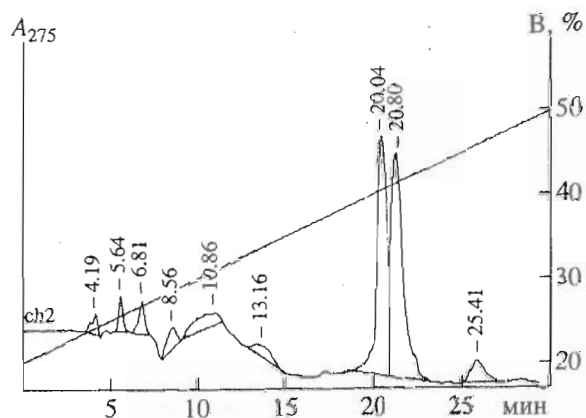


Рис. 2. Адсорбционная ВЭЖХ 5'-О-(*D,L*-эритро-церамидфосфо)тимидина (VIII) на колонке (250 × 4.6 мм) Zorbax Sil (Du Pont Instruments) в системе А с градиентом концентрации системы В от 20 до 50% за 30 мин.

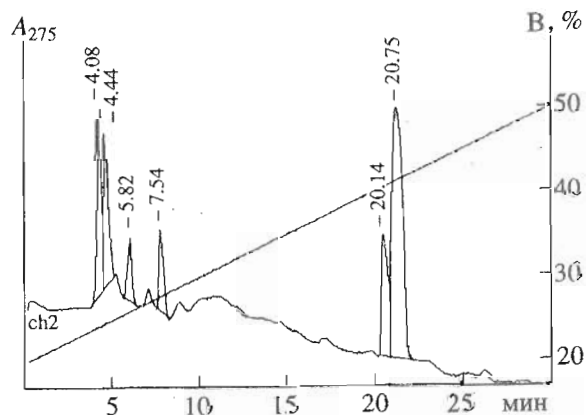


Рис. 3. Адсорбционная ВЭЖХ. Совместная хроматография 5'-О-(*D*-эритро-3-бензоилцерамидфосфо)-3'-ацетилтимидина (VIIa\*) и 5'-О-(*D,L*-эритро-3-бензоилцерамидфосфо)-3'-ацетилтимидина (VIIa) на колонке (250 × 4.6 мм) Zorbax Sil (Du Pont Instruments) в системе А с градиентом концентрации системы В от 20 до 50% за 30 мин.

соединения (VII) обнаружены два сигнала одинаковой интенсивности (0.21 и 0.43 м. д.).

Таким образом, с использованием амидофосфитного и Н-фосфонатного методов в растворе с высоким выходом был получен церамидфосфотимидин, послуживший в дальнейшем свидетелем для контроля синтеза на твердой фазе. Показано, что диастереомеры церамидфосфотимидина, содержащие остатки *D*- и *L*-эритро-сфинганина, могут быть разделены с помощью адсорбционной ВЭЖХ.

Для отработки условий проведения твердофазной конденсации носитель с привитым диметокситритилтимидином обрабатывали 3% дихлоруксусной кислотой в дихлорметане и промывали ацетонитрилом. По амидофосфитному методу конденсацию на твердой фазе осуществляли, используя 0.1 М раствор амидофосфита церамида (II) в дихлорметане и 0.5 М раствор тетразола в ацетонитриле. Конденсацию проводили 15 мин. Следует отметить, что из-за плохой растворимости амидофосфита (II) в ацетонитриле необходимы дополнительные промывки полимерного носителя метилхлоридом до и после конденсации. Фосфиттриэфир (IVб), связанный с носителем, окисляли 0.1 М водно-пиридиновым раствором иода до фосфата (VIIб). Отщепление продукта от носителя и снятие защитных групп проводили 0.1 н. раствором метилата натрия (1 ч при комнатной температуре) или концентрированным раствором водного аммиака (ночь, 55°C). При использовании стандартных условий для отщепления от носителя (20% водный аммиак, 1 ч при 55°C) происходило отщепление продукта (VIII) от носителя, однако бензоильная защитная группа за это время удалялась лишь частично. При аммонолизе в течение ночи удаление бензоильной защитной группы происходило полностью.

По Н-фосфонатному методу конденсацию на твердой фазе проводили с фосфонатом (III) в присутствии TPSCI в пиридине. Далее носитель промывали пиридином и окисляли 0.1 М иодом в водно-пиридиновом растворе. Полученный продукт отщепляли от носителя и удаляли защитные группы как описано выше. Выход продукта реакции на твердой фазе определяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Он составил 45% при синтезе амидофосфитным способом и 55% – Н-фосфонатным. Церамидфосфотимидин (VIII), синтезированный по амидофосфитному и фосфонатному методам на твердой фазе, был идентифицирован с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и ТСХ с аутентичным образцом, полученным синтезом в растворе.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что как амидофосфитный, так и Н-фосфонатный методы синтеза с успехом могут быть использованы для 5'-концевого введения

церамидных остатков в олигонуклеотиды на последней стадии твердофазного синтеза. Невысокие выходы при твердофазном синтезе могут быть объяснены труднодоступностью 5'-гидроксильной группы тимидина для объемистых гидрофобных амидофосфитного или Н-фосфонатного компонентов, содержащих остаток сфинганина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ЯМР-спектры измеряли на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали при рабочей частоте 200 МГц в дейтерированных растворителях (внешний стандарт – гексаметилдисилазан), спектры <sup>31</sup>P-ЯМР – при рабочей частоте 80 МГц с широкополосным подавлением спин-спиновой взаимоделимости <sup>31</sup>P-ЯМР-{<sup>1</sup>H}; значения химических сдвигов приведены относительно 85% ортофосфорной кислоты в качестве внешнего стандарта. УФ-Спектры записывали на приборе Specord UV VIS (Германия). Твердофазную конденсацию проводили на ручном синтезаторе PC 100 (Cruchem, Англия), используя в качестве носителя макropористое стекло с привитым 5'-О-диметокситритилтимидином (DMTr-CPG type II, Sigma) с удельной нагрузкой 54 мкмоль/г.

Адсорбционную ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer (ФРГ) на колонке (250 × 4.6 мм) Zorbax Sil, Du Pont Instruments (США) при скорости элюции 1 мл/мин в системах растворителей хлороформ–пентан–ТЕА, 75 : 25 : 4 (А); хлороформ–метанол–ТЕА, 75 : 25 : 4 (В), в градиенте концентрации В от 20 до 50% за 30 мин. Обращенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Beckman Gold на колонке (250 × 4.6 мм) Zorbax ODS, Du Pont Instruments (США) в 0.1 М ацетате аммония с градиентом концентрации изопропанола от 50 до 75% за 25 мин и скоростью элюции 1 мл/мин. Для препаративной колоночной хроматографии использовали колонку (250 × 50 мм) с силикагелем Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), элюируя вещества смесью хлороформ–1% ТЕА с градиентом концентрации метанола от 0 до 10% за 1 ч. ТСХ осуществляли на пластинах DC-Alufohlen Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системах растворителей: 1) хлороформ–метанол–25% водный аммиак, 30 : 5 : 1; 2) хлороформ–метанол–ТЕА, 10 : 3 : 0.3; 3) гексан–этилацетат–ТЕА, 10 : 2 : 0.5.

Обнаружение пятен проводили по поглощению в УФ при 254 нм, нагреванием до 150°C, фосфорсодержащих соединений – реактивом Васьковского. Температуру плавления измеряли на приборе Voetius (Германия).

Ацетонитрил (Lobasol), диизопропиламин (Aldrich) перегоняли над гидридом кальция. Пиридин, ТЕА, *N*-метилморфолин перегоняли последовательно над нингидрином, гидроксидом натрия,



гидридом кальция. В работе использовали дихлоруксусную кислоту, трихлорид фосфора, 1,2,4-триазол (Merck), тетразол (Fluka), TPSCI (Fluka), *трет*-бутилгидропероксид (3.7 М/CCl<sub>4</sub>) (Fluka). Рацемический *эритро*-3-О-бензоилцерамид с т. пл. 78–80°C получали по методу [18], бис(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфин [19], 3'-О-ацетилтимидин – по методу [20], 3-О-бензоил-2-N-стеароил-D-сфинганин-1-О-(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтилфосфинил (II\*) (<sup>31</sup>P-ЯМР: 147.6 и 148.4 м. д.) – по методу [16].

**3-О-Бензоил-2-N-стеароил-*рас*-сфинганин-1-О-(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтилфосфинил (II).** К раствору 0.5 г (0.75 ммоль) 3-бензоилцерамида (I) и 0.09 г (0.50 ммоль) диизопропиламонийтетразолида в 5 мл хлористого метилена прибавляли 0.5 мл (1.50 ммоль) бис(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтилфосфина. Через 2 ч реакционную массу выливали в насыщенный раствор бикарбоната натрия, экстрагировали 20 мл хлористого метилена, органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (3 × 10 мл), сушили безводным сульфатом натрия, упаривали до масла. Остаток хроматографировали на силикагеле. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, упаривали досуха, сушили в вакууме масляного насоса. Выход 0.6 г (93%). Т. пл. 40.5–41.5°C. R<sub>f</sub> 0.63 и 0.52 (3) (смесь диастереомеров по фосфору). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>): 147.6 и 148.4 м. д. [16].

**3-О-Бензоил-2-N-стеароил-*рас*-сфинганин-1-N-фосфонат, триэтиламмониевая соль (III).** К раствору 1.71 г (24.8 ммоль) 1,2,4-триазола, 7.45 мл (67.8 ммоль) N-метилморфолина в 60 мл хлористого метилена добавляли 0.65 мл (7.5 ммоль) трихлорида фосфора. Через 30 мин смесь охлаждали до –10°C и по каплям в течение 20 мин добавляли 1.0 г (1.5 ммоль) 3-О-бензоилцерамида (I) в 3 мл хлористого метилена. Затем охлаждение прекращали и реакционную массу оставляли на ночь при перемешивании. Через 12 ч добавляли 10 мл ТЕА, промывали водой (6 × 20 мл), водный раствор промывали хлористым метилом (3 × 10 мл), органические растворы объединяли, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали до масла, остаток хроматографировали на силикагеле. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, упаривали досуха, сушили в вакууме масляного насоса. Выход 1.21 г (97%). R<sub>f</sub> 0.33 (2). Т. пл. 53–54°C. <sup>31</sup>P-ЯМР (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 5.70 м. д. [16].

**3-О-Бензоил-2-N-стеароил-*рас*-сфинганин-1-О-фосфо-5'-(3'-О-ацетил)тимидин, триэтиламмониевая соль (VIIa).** Способ "а". Амидофосфит церамида (II) (0.17 г, 0.19 ммоль) и 0.06 г (0.21 ммоль) 3'-О-ацетилтимидина упаривали со смесью хлористый метилен–ацетонитрил, 1 : 1 (3 × 4 мл), растворяли в 3 мл хлористого метилена и при перемешивании добавляли 0.02 г (0.26 ммоль) 1Н-тетразо-

ла в 0.7 мл ацетонитрила. Через 40 мин к реакционной массе добавляли 0.205 мл (0.76 ммоль) 3.7 М раствора *трет*-бутилгидропероксида в четыреххлористом углероде. Через 1 ч реакционную массу упаривали досуха, растворяли в 10 мл дихлорметана, промывали водой (3 × 2 мл), водный раствор промывали дихлорметаном (2 × 2 мл), органические растворы объединяли, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали досуха. Остаток растворяли в 4 мл ацетонитрила и добавляли 4 мл ТЕА. Через 30 мин реакционную массу упаривали до масла, остаток хроматографировали на силикагеле. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, упаривали досуха, сушили в вакууме масляного насоса. Выход 0.13 г (60%). R<sub>f</sub> 0.45 (1). Адсорбционная ВЭЖХ, время выхода 16.73 и 17.49 мин. Т. пл. 69–71°C. УФ, λ<sub>max</sub>(ε) (CH<sub>3</sub>OH–(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O, 1 : 1): 270 нм (9480). <sup>31</sup>P-ЯМР (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.21 и 0.43 м. д. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ (м. д.): 0.85 (т, 6H, CH<sub>3</sub>-Sph, CH<sub>3</sub>-St), 1.15–1.40 (м, 63H, 27CH<sub>2</sub>-Sph, St, 3CH<sub>3</sub>-TEA), 1.50–1.78 (м, 4H, 4-CH<sub>2</sub>-Sph, 3-CH<sub>2</sub>-St), 1.85 (2 с, 3H, CH<sub>3</sub>-Thd), 2.01 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.19 (м, 4H, 2'H-Thd, 2''H-Thy, 2-CH<sub>2</sub>-St), 3.03 (м, 6H, 3CH<sub>2</sub>-TEA), 3.53 (кв, 2H, J<sub>12</sub> 6.0 Гц, 1-CH<sub>2</sub>-Sph); 4.02 (м, 1H, 4'H-Thd), 4.05 (м, 2H, 5'H-Thd, 5''H-Thd), 4.42 (м, 1H, 2-CH-Sph), 5.27 (м, 2H, 3''H-Thd, 3-CH-Sph), 6.33 (2т, 1H, J<sub>12</sub> 7.1 Гц, 1'H-Thd), 7.30–7.54 (м, 3H, Ar), 7.62 (д, 1H, NH-Sph), 7.94–8.02 (м, 3H, 6H-Thd, Ar), 8.36 (д, 1H, NH-Thd), 11.96 (ш, 1H, HN<sup>+</sup>-TEA).

**Способ "б".** Н-Фосфонат (III) (0.20 г, 0.24 ммоль) и 0.075 г (0.26 ммоль) 3'-О-ацетилтимидина упаривали с пиридином (3 × 1 мл), растворяли в 1.5 мл пиридина, добавляли 0.3 г (0.96 ммоль) TPSCI. Через 1 ч к реакционной массе добавляли 1.2 мл 0.1 М иода в смеси THF–Py–вода (8 : 1 : 1). Через 20 мин приливали 1.2 мл 3% водного раствора тиосульфата натрия, реакционную массу упаривали, остаток растворяли в 10 мл хлороформа, промывали водой (3 × 5 мл), водный раствор экстрагировали хлороформом (3 × 5 мл), органические растворы объединяли, упаривали до масла. Остаток хроматографировали на силикагеле. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, упаривали досуха, сушили в вакууме масляного насоса. Выход 0.90 г (56%).

**3-О-Бензоил-2-N-стеароил-D-эритро-сфинганин-1-О-фосфо-5'-(3'-О-ацетил)тимидин (VIIa\*)** получали из соответствующего амидофосфита (II\*) как описано для церамидфосфотимидина (VIIa). Адсорбционная ВЭЖХ: время удерживания 20.75 мин.

**2-N-Стеароил-*рас*-сфинганин-1-О-фосфо-5'-тимидин, натриевая соль (VIII).** Церамидфосфотимидин (VI) (0.13 г, 0.116 ммоль) растворяли в 1.5 мл абсолютного эфира и 1.5 мл абсолютного метанола, добавляли 3 мл 0.2 н. метилата натрия.

Через 15 мин реакционную массу упаривали до масла, разбавляли 10 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (2 × 2 мл), ацетонитрилом (2 × 1 мл), сушили на фильтре. Выход 0.9 г (87.4%).  $R_f$  0.1 (1), 0.71 (2). Адсорбционная ВЭЖХ: время удерживания 20.04 и 20.80 мин. Т. пл. 230–232°C. УФ,  $\lambda_{\max}(\epsilon)$  (CH<sub>3</sub>OH–H<sub>2</sub>O, 1 : 1): 275 нм (6020). <sup>31</sup>P-ЯМР (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>OH–D<sub>2</sub>O, 2 : 3 : 1): 2.15 м. д. (ш). <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD),  $\delta$  (м. д.): 0.89 (т, 6H, CH<sub>3</sub>-Sph, CH<sub>3</sub>-St), 1.28 (м, 54H, 27(CH<sub>2</sub>)-Sph, St), 1.57 (м, 4H, 4-CH<sub>2</sub>-Sph, 3-CH<sub>2</sub>-St), 1.91 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-Thd), 2.21 (м, 2-CH<sub>2</sub>-St), 3.24–5.20 (м, 10H, 1-CH<sub>2</sub>-Sph, 2-CH-Sph, 3-CH-Sph, 2'-H-Thd, 2''H-Thd, 3'H-Thd, 4'H-Thd, 5'H-Thd, 5''H-Thd), 6.34 (т, 1H, J<sub>12</sub>: 6.9 Гц, 1'H-Thd), 7.80 (м, 1H, 6H-Thd).

**Проведение амидитной конденсации на твердой фазе.** Навеску носителя помещали в колонку для ручного синтезатора и обрабатывали по протоколу:

Промывка	MeCN	1 мин
Детритилирование	3% DCA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 »
Промывка	MeCN	1 »
»	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 »
Конденсация	0.5 М тетразол/MeCN + + 0.1 М амидофосфит (II)/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 : 1 v/v)	15 »
Промывка	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 »
»	MeCN	1 »
Окисление	0.1 М I <sub>2</sub> в THF/Py/H <sub>2</sub> O	1 »
Промывка	MeCN	1 »

Носитель сушили, пропуская через колонку аргон, переносили во флакон емкостью 1 мл, прибавляли 1 мл концентрированного водного аммиака и выдерживали 12 ч при 55°C либо прибавляли 0.2 мл 0.1 н. раствора метилата натрия в метаноле и выдерживали 1 ч при 20°C. Водный раствор нейтрализовали уксусной кислотой до нейтральной реакции. Анализ продуктов реакции проводили с помощью ТСХ и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

**Проведение фосфонатной конденсации на твердой фазе.** Навеску носителя помещали в колонку для ручного синтезатора и обрабатывали по протоколу:

Промывка	MeCN	1 мин
Детритилирование	3% DCA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 »
Промывка	MeCN	1 »
Конденсация	0.5 М TPSCl/Py + 0.1 М H- фосфонат (III)/Py (1 : 1 v/v)	15 »
Промывка	MeCN	1 »
Окисление	0.1 М I <sub>2</sub> в THF/Py/H <sub>2</sub> O	1 »
Промывка	MeCN	1 »

Носитель сушили, пропуская через колонку аргон, переносили во флакон емкостью 1 мл, прибавляли 1 мл концентрированного водного аммиака и выдерживали 12 ч при 55°C либо прибавляли 0.2 мл 0.1 н. раствора метилата натрия в метаноле и выдерживали 1 ч при 20°C. Водный раствор нейтрализовали уксусной кислотой до нейтральной реакции. Анализ продуктов реакции проводили с помощью ТСХ и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук проф. Е.Н. Звонковой за ценные замечания и обсуждение результатов при выполнении и написании работы, а также сотрудникам кафедры биотехнологии МИТХТ С.Г. Алексеевой и М.В. Чудинову за снятие ЯМР-спектров.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-03-09044а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hong C.I., Kirisits A.J., Nechaev A., Buchheit D.J., West C.R. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 1380–1386.
- Hong C.I., West C.R., Bernacki R.J., Tebbi C.K., Berdel W.E. // *Lipids.* 1991. V. 26. P. 1437–1444.
- Hong C.I., Nechaev A., Kirisits A.J., Vig R., West C.R. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 1785–1790.
- Shuto S., Itoh H., Ueda S., Imamura S., Fukukawa K., Tsujino M., Matsuda A., Ueda T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1988. V. 36. P. 209–217.
- Guerra F.I., Neumann J.M., Huynh-Dinh T. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 3581–3584.
- Neumann J.M., Herve M., Debouzy J.C., Guerra F.I., Gouyette C., Dupraz B., Huynh-Dinh T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 4270–4277.
- Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 6112–6117.
- Letsinger R.L., Chaturvedi S.K., Farooqui F., Salunkhe M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 7535–7536.
- Gryaznov S.M., Lloyd D. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5904–5915.
- Vu H., Singh P., Lewis L., Zendejvi J.G., Jayaraman K. // *Nucleosides Nucleotides.* 1993. V. 12. P. 853–864.
- Kabanov A.V., Vinogradov S.V., Ovcharenko A.O., Krivonos A.V., Melik-Nubarov N.S., Kiselev V.I., Severin E.S. // *FEBS Lett.* 1990. V. 259. P. 327–330.
- Saison-Behmoaras T., Tocque B., Rey I., Chassignol M., Thuohg N.T., Helene C. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 1111–1118.
- Bruzik K.S., Salamonczyk G., Stec W.J. // *J. Org. Chem.* 1986. V. 51. P. 2368–2370.
- Bruzik K.S. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986. P. 329–331.



15. Замятина А.Ю., Бушнев А.С., Швец В.И. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1253–1296.
16. Франтова А.Ю., Бушнев А.С., Звонкова Е.Н., Швец В.И. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1562–1573.
17. Шастина Н.С., Эйнисман Л.И., Степанов А.Е., Швец В.И. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 71–75.
18. Shapiro D. Chemistry of Sphingolipids. Paris: Hermann, 1969. P. 111.
19. Shea R.S., Marsters J.C., Bischofberger N. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3777–3783.
20. Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach / Ed. M.J. Gait. Oxford: J.R.L. Press, 1984.

## Preparation of Ceramide Phosphothymidine, a Model Compound for the Sphingophosphooligonucleotide Synthesis

O. V. Oskolkova\*,<sup>1</sup> A. Yu. Zamyatina\*, V. I. Shvets\*, D. S. Esipov\*\*, and V. G. Korobko\*\*

\* *Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia*

\*\* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

**Abstract**—Ceramide phosphothymidine, a model compound for obtaining nucleotides with a 5'-terminal sphingophospholipid residue, was synthesized by amidophosphite and hydrogen phosphonate solution and solid phase techniques. The ceramide phosphothymidine diastereomers containing the *D*- and *L*-erythro-sphinganine residues were shown to be separable by adsorption HPLC.

*Key words:* ceramide phosphothymidine, nucleosides, modified nucleotides, phosphite triester method, hydrogen phosphonate method, sphingophospholipids.

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