



УДК 547.963.32.07

## АМИНОНУКЛЕОЗИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

## VIII \*. ИНГИБИТОРЫ ДОНОРНОГО УЧАСТКА ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА РИБОСОМ.

## СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЯ В СИСТЕМЕ IN VITRO

Озолс А. М., Гюсенюк А. В., Дяткина Н. В.,  
Атразев А. М., Ажаев А. В., Куханова М. К.,  
Граевский А. А., Готтих В. П.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Смрт П.

Институт органической химии и биохимии Академии наук ЧССР, Прага

Разработан метод синтеза конкурентных ингибиторов модельных субстратов донорного участка пептидилтрансферазного центра рибосом. Их основной структурной единицей является 3'-дезоксиг-3'-(N-ациламиноацетиламидо)аденозин-5'-фосфат, связывающийся с донорным участком с константой диссоциации  $\sim 10^{-3}$  М. Синтез этого типа соединений проведен конденсацией 3'-дезоксиг-3'-ампфоаденозин-5'-фосфата с имидазолидами N-ациламинокислот. Введение в 5'-положение названной структурной единицы цитидина или 3'-дезоксиг-3'-аминоцитидина повышает сродство производных динуклеозидфосфатов к донорному участку на 1-2 порядка, а удлинение на фрагмент CpC увеличивает сродство на 3 порядка. Синтез фосфамидных аналогов динуклеозидфосфатов и тринуклеозиддифосфатов осуществляется ступенчатой конденсацией 3'-дезоксиг-3'-аминонуклеозида с 3'-дезоксиг-3'-азидонуклеозид-5'-фосфатом, активированным с помощью имидазолида, либо непосредственной конденсацией компонентов синтеза в воде с участием водорастворимого карбодиимида. Определены также константы ингибирования реакции для названных соединений.

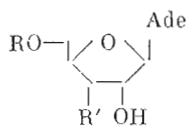
Изучение пептидилтрансферазного центра рибосом с помощью модельных субстратов — фрагментов 3'-конца аминоацил-tРНК и пептидил-tРНК — широко проводится более 10 лет [2, 3]. Последние годы характеризуются попытками количественно оценить сродство субстратов к пептидилтрансферазному центру, а эти задачи, в свою очередь, требуют использования аналогов модельных субстратов, не содержащих малоустойчивую в условиях эксперимента сложноэфирную связь.

В этой статье мы сообщаем о синтезе нового типа конкурентных ингибиторов донорного участка пептидилтрансферазного центра, а также о результатах исследования с их помощью рибосом *E. coli*.

В качестве модельных субстратов донорного участка успешно применяются pA (fMet-), CpA (fMet-) и CpCpA (fMet-) [2, 3]. Нами осуществлен синтез двух типов аналогов этих соединений, содержащих амидную связь вместо сложноэфирной между ациламинокислотным остатком и нуклео-

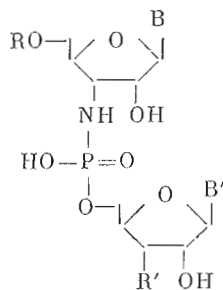
\* Сообщение VII см. [1].

тидным компонентом. Первый тип амидных аналогов объединяет вещества (Ia — д). Второй тип аналогов представлен соединениями (IIa, б), отличающимися от соединений первого типа природой межнуклеотидной связи (см. схему).



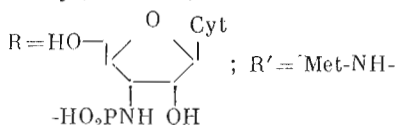
(Ia—ii)

- а) R = H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R' = Met-NH-
- б) R = H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R' = Ms-Met-NH-
- в) R = H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R' = Ms-Gly-NH-
- г) R = Cp; R' = fMet-NH-
- д) R = CpCp; R' = Ms-Leu-NH-
- е) R = H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R' = NH<sub>2</sub>
- ж) R = Cp; R' = NH<sub>2</sub>
- з) R = CpCp; R' = NH<sub>2</sub>
- и) R = Cp; R' = N<sub>3</sub>

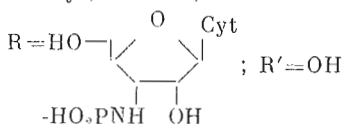


(IIa—з)

- а) B = Cyt; B' = Ade; R = H; R' = Ms-Met-NH-
- б) B = Cyt; B' = Ade;



- в) B = Cyt; B' = Ade; R = H; R' = NH<sub>2</sub>
- г) B = Cyt; B' = Ade; R = H; R' = N<sub>3</sub>
- д) B = B' = Cyt; R = H; R' = NH<sub>2</sub>
- е) B = B' = Cyt; R = H; R' = N<sub>3</sub>
- ж) B = Cyt; B' = Ade;



- з) B = Cyt; B' = Ade; R = H; R' = OH

с — формил; Ms — метансульфонил

Синтез амидов (Ia — д) осуществлен имидазольным методом, разработанным для природных рибонуклеотидов [4], исходя из N-ациламинокислот и соответствующих 3'-дезоксиз-3'-аминонуклеотидов или их 5'-производных (табл. 1—3).

Синтез аминокнуклеотида (Ie) описан ранее [5]; олигонуклеотиды (Iж) и (Iз) также синтезированы известным способом [6]. В случае аминокнуклеотида (Iж) вместо исходного 5'-O-ацетил-2'-O-тетрагидропиридин-N-ацетилцитидин-3'-фосфата для конденсации с защищенным 3'-дезоксиз-3'-азидоаденозином мы применили 5',2',N-триацетилцитидин-3'-фосфат [7], что позволило удалить все защитные группы одной обработкой.

Динуклеозидфосфат (IIв), содержащий межнуклеотидную фосфамидную связь, получен конденсацией 3'-дезоксиз-3'-азидоаденозин-5'-фосфоимидазола с 3'-дезоксиз-3'-аминоцитидином методом, предложенным ранее [8]. Конденсация проходила с выходом не ниже 70%, и полученный азид (IIг) легко восстанавливался в амин (IIв) с помощью Ph<sub>3</sub>P в NH<sub>4</sub>OH [5]. С N-метил-L-метионил-N'-имидазолом амин (IIв) образовывал ациламинопроизводное (IIа).

Однако для синтеза динуклеозидфосфата (IIд) и тринуклеозиддифосфата (IIб) использование имидазольной активации оказалось мало пригодным из-за низкого выхода основного вещества вследствие прохождения побочных реакций. Более удачным для синтеза олигонуклеотидов, содержащих межнуклеотидную фосфамидную связь, оказалось применение в качестве конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)кар-

Таблица 1

## Выход и некоторые характеристики синтезированных веществ

Соединение	Выход, %	$\lambda_{\text{макс}}$		$E_{\text{рН}}^{\text{рН}} 2,5$	$E_{\text{рН}}^{\text{рН}} 7,5$	$R_f$ в системе	
		рН 7,0	рН 2,5			А	Б
(Ии)	67	261	262 282 *	0,42	0,29	—	0,60
(Из)	97	261	282	1,50	0,32	0,11	0,42
(Иг)	71	261	282	0,48	0,31	0,24	0,53
(Ив)	97	261	282	1,44	0,32	0,10	0,41
(Ие)	82	268	276	0,64	0,36	0,17	0,64
(Ид)	95	268	276	1,18	0,40	0,08	0,43
(Ia)	45	259	—	0,00	0,77	0,23	0,39
(Iб)	43	259	—	0,00	0,77	0,25	0,40
(Iв)	61	259	—	0,00	0,89	0,15	0,19
(Iг)	61	261	262 282 *	0,46	0,33	0,22	0,45
(IIa)	63	261	282	0,47	0,31	0,28	0,54
(Iд)	3-4	264	—	0,18	—	0,30	—
			264	0,45	0,51	0,11	0,38
(IIб)	28	262	282 *				
(IIз)	30	263	269	0,73	0,69 **	0,08	0,19

\* Плечо. \*\*  $E_{\text{пикр. к-та}}^{\text{рН}} 7,5$

Таблица 2

Химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц) динуклеозидфосфатов и тринуклеозиддифосфата

Соединение	Аденин		Цитозин (1 или 2)		Аденозин	Цитидин (1 или 2)	Протоны сахара + HOD
	8-Н	2-Н	6-Н ( $J_{6,5}$ )	5-Н	1'-Н ( $J_{1', 2'}$ )	1'-Н ( $J_{1', 2'}$ )	
(Iи)	8,33с	8,09с	7,79д (8,0)	5,97д	6,02д (5,0)	5,74д (3,2)	5,00-3,65м
(IIз)	8,51с	8,23с	7,85д (7,5)	5,66д	6,10д (2,5)	5,61с	5,13-3,19м
(IIг)	8,45с	8,12с	8,03д (8,0)	5,83д	6,05д (3,0)	5,56с	5,12-3,30м
(IIе)	—	—	7,99д (7,5) 7,96д (7,5)	5,89д 5,87д	—	5,80д (1,5) 5,63с	5,16-3,15м
(Iз)	8,39с	8,21с	7,73д (8,0)	5,86д	6,17д (2,8)	5,75д (3,2)	5,00-3,64м
(IIв)	8,41с	8,14с	7,89д (8,0)	5,71д	6,17д (2,5)	5,55с	5,08-3,15м
(IIд)	—	—	8,12д (7,5) 8,03д (7,5)	5,91д 5,87д	—	5,80с 5,67с	4,80-3,35м
(IIж)	8,55с	8,30с	8,07д (7,5) 7,99д (7,5)	5,80д 5,62д	6,01д (4,0)	5,64с 5,62с	4,90-3,10м

бодимида. Ранее сообщалось об использовании этого реагента для получения фосфамидных аналогов 3',5'-сусло-АМР [9, 10]. Выход азида (Иж) составил 80%; азидогруппа в нем легко восстанавливалась до аминогруппы. Для упрощения синтеза и уменьшения количества превращений тринуклеозиддифосфатного производного динуклеозидфосфат (IIд) далее

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц) ациламинокислотных амидов аминоклетидов

Соединение	Аденин		Цитозин (1 или 2)		Аденозин 1'-Н ( $J_{1', 2'}$ )	Цитидин (1 или 2) 1'-Н ( $J_{1', 2'}$ )	Другие протоны
	8-Н	2-Н	6-Н ( $J_{6'5'}$ )	5-Н			
(Ia)	8,49с	8,16с	—	—	6,13д (2,5)	—	CHO 8,12 с; CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> 2,64м и 2,13м; CH <sub>3</sub> 2,16с; протоны сахара + СН-метионина + НОД 5,16-3,66м
(Iб)	8,45с	8,07с	—	—	6,11д (1,8)	—	CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> 3,16с; протоны сахара, метионина + НОД 5,02-4,01м
(Iв)	8,45с	8,18с	—	—	6,13д (2,2)	—	CH <sub>2</sub> (глицин) 4,06с; протоны сахара + НОД 5,00-3,9м
(Iг)	8,45с	8,25с	7,75д (8,0)	5,85д	6,18д (1,8)	5,75д (3,0)	CHO 7,99с; CH <sub>3</sub> 2,16с; CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> 2,65м и 2,14м, протоны сахара + НОД 5,10-3,80 м
(IIa)	8,53с	8,25с	8,03д (8,0)	5,83д	6,15д (1,8)	5,59с	CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> 3,15с; CH <sub>3</sub> 2,15с; CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> 2,63м и 2,13м, протоны сахара + НОД, 5,00-3,40м
(IIб)	8,44с	8,17с	8,03д (7,5)	5,88д 5,73д	6,12д (1,5)	5,60с 5,55с	CHO 8,07с; CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> 2,61м и 2,10м; 2,13с; протоны сахара + СН метионина + НОД 4,97-3,27м

конденсировали с предварительно ацилированным мононуклеотидным фрагментом (Ia), что сразу дало необходимый амид (IIб). Аналогично конденсацией динуклеозидфосфата (IIд) с рА выходом 30% был получен тринуклеозиддифосфат (IIж).

Особенностью синтеза динуклеозидфосфатов (IIв) и (IIд), а также тринуклеозиддифосфатов (IIб) и (IIж) по сравнению с синтезом соответствующих природных соединений *рибо*-ряда является возможность проведения стадии конденсации без защиты 2'- и 5'-гидроксильных и аминогрупп нуклеиновых оснований обоих компонентов реакции при сохранении высокого выхода конечного продукта.

Все синтезированные соединения были испытаны нами в качестве ингибиторов донорного участка пептидилтрансферазного центра рибосом *E. coli*. Для этого определены равновесная константа связывания  $K_s$  для меченого по лейцину тринуклеозиддифосфата [<sup>14</sup>C] (Id) или константы связывания немеченых соединений по конкуренции с модельным субстратом донорного участка CrArCrCrA(Ac-[<sup>14</sup>C]Leu-) [11]. Кроме того, измерены константы ингибирования ( $K_i$ ) реакции CrArCrCrA(Ac-[<sup>14</sup>C]Leu-) с пурамином [12]. Некоторые данные по  $K_s$  и  $K_m$  нами уже сообщены [11-12].

В табл. 4 представлены все полученные нами результаты определения  $K_s$  ( $K_{дис}$ ) и  $K_i$  синтезированных веществ, а на рисунке — графики определения  $K_i$  и  $K_{дис}$  для соединений (IIг) и (IIа) (методику см. [11]). Из рисунка, а также в соответствии с [11-12] видно, что все приведенные в табл. 4 соединения являются конкурентными ингибиторами связывания CrArCrCrA(Ac-[<sup>14</sup>C]Leu-) с рибосомами.

Из анализа табл. 4 можно сделать некоторые выводы: 1) сходство субстратов к донорному участку повышается по мере увеличения длины нуклеотидного компонента; 2) природа ацильного остатка (f или Ms) на  $K_{дис}$  влияния не оказывает; 3) замена гидроксила в 3'-положении конце-

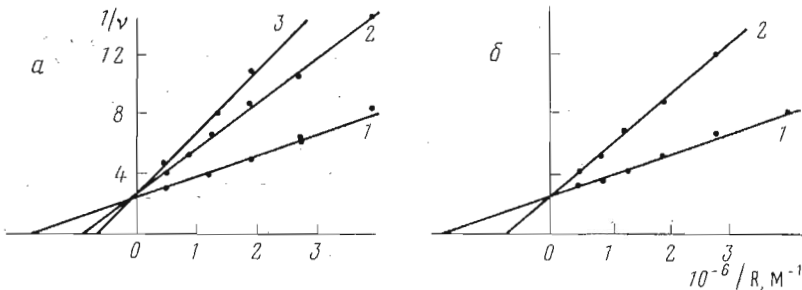
Равновесные ( $K_{дис}$ ) и кинетические ( $K_i$ ) константы связывания модельных субстратов и ингибиторов с донорным участком пептидилтрансферазного центра рибосом *E. coli*

Соединение	$K_i, M$	$K_{дис}, M$
(Iб)	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
(Iв)	$1,4 \cdot 10^{-3}$	
pA (fMet-)	$3,6 \cdot 10^{-3}$ [12]	$2,3 \cdot 10^{-3}$ [11]
(Iг)	$1,1 \cdot 10^{-4}$ [12]	$1,8 \cdot 10^{-4}$ [14]
(IIа)	$3 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$
СрА (fMet-) *		$5 \cdot 10^{-4}$ [11]
СрА (Ms-Met-) *		$4 \cdot 10^{-4}$
(IIд)		$3,6 \cdot 10^{-6}$ [11]
(IIб)	Не связывается с донорным участком	
СрАрСрСрА (Ac-Leu-)	$6,8 \cdot 10^{-8}$	$5,8 \cdot 10^{-7}$

\* Синтезированы соответственно [4].

вого аденозина на  $NH_2$ -группу в составе мононуклеотидного производного практически не сказывается на  $K_{дис}$ , но слегка понижает  $K_i$ . Эффект повышения сродства более выражен при аналогичной замене в составе производных динуклеозидфосфата; 4) чрезвычайно большое значение имеет замена промежуточной фосфодиэфирной связи на фосфоэфирамидную. Для аналога (IIа)  $K_{дис}$  на 2 порядка ниже  $K_{дис}$  соответствующего сму ациламинодинуклеозидфосфата (Iа). Мы полагаем, что причиной этого является отличие конформации амидного аналога от конформации природного соединения. Подтверждением указанного является необычное поведение амидного аналога (IIб), который вообще не связывается с донорным участком пептидилтрансферазного центра.

Кроме того, следует отметить более низкие значения  $K_i$  по сравнению с  $K_{дис}$ . Определение  $K_i$  проводится в присутствии пурамицина — субстрата, акцепторного участка, а  $K_{дис}$  — при вакантном акцепторном участке. Поэтому мы полагаем, что здесь наблюдается положительное кооперативное влияние субстрата акцепторного участка на связывание донорного субстрата (ингибитора). Качественные данные в пользу такого влияния сообщались и ранее [2, 3, 13].



Ингибирование связывания СрАрСрСрА (Ac-[ $^{14}C$ ]Leu-) с рибосомами с помощью ампуноаналогов олигонуклеотидов: а — концентрация СрАрСрСрА (Ac-[ $^{14}C$ ]Leu-)  $3 \cdot 10^{-8}$  М, связывание в отсутствие ингибитора (1), в присутствии аналога (IIа)  $4,2 \cdot 10^{-6}$  М (2) и  $6 \cdot 10^{-6}$  М (3); б — концентрация СрАрСрСрА (Ac-[ $^{14}C$ ]Leu-)  $4,2 \cdot 10^{-8}$  М, связывание в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии аналога (Iа)  $2 \cdot 10^{-4}$  М.  $1/v$  — среднее число молекул СрАрСрСрА (Ac-[ $^{14}C$ ]Leu-), связанных с одной рибосомой, R — концентрация свободных рибосом

## Экспериментальная часть

Ациламиноацильные производные рА (fMet-), рА (Ms-Met-), СрА (fMet-) и СрА (Ms-Met-) синтезированы по [4]. Рибосомы *E. coli* MRE-600 выделены известным методом [14]. Пентануклеотид СрАрСрСрА (Ac-[<sup>14</sup>C]Leu-) получен из [<sup>14</sup>C]Leu-тРНК *E. coli* ацетилированием Ac<sub>2</sub>O и гидролизом T<sub>1</sub>-рибонуклеазой; удельная радиоактивность [<sup>14</sup>C]лейцина 348 мКи/ммоль (Amersham, Англия). Из суммарной тРНК *E. coli* и [<sup>14</sup>C]фенилаланина готовили [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК и СрАрСрСрА ([<sup>14</sup>C]Phe-), удельная радиоактивность 220 мКи/ммоль (UVVVR, Чехословакия). Очистку СрАрСрСрА (Ac-[<sup>14</sup>C]Leu-) и СрАрСрСрА ([<sup>14</sup>C]Phe-) проводили электрофорезом (3500 В, 100 мА, 2 ч) на ватмане 3 ММ.

Для БХ использовали системы: *n*-BuOH — вода — AcOH, 3 : 2 : 1 (А); *изо*-PrOH — 25% NH<sub>4</sub>OH — вода, 7 : 1 : 2 (Б). Спектры ПМР всех соединений снимали на приборе Varian XL-100 (США) в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O; внутренним стандартом служил *трет*-бутанол. УФ-спектры измерены на спектрофотометре Beckman 25 (США).

*Цитидил-3' → 5'-(3'-дезоксидезокси-3'-аминоаденозин (Iж))*. К раствору 2'-О-бензоил-N<sup>6</sup>-добензоил-3'-дезоксидезокси-3'-азидоаденозина (155 мг, 0,27 ммоль) в 10 мл пиридина прибавляли пиридиниевую соль 2',5'-O-N<sup>4</sup>-триацетилцитидин-5'-фосфата (295 мг, 0,5 ммоль), смесь упаривали досуха, остаток упаривали с пиридином (2×10 мл), растворяли в 10 мл пиридина, упаривали до объема 6—7 мл, добавляли N,N'-дициклогексилкарбодиимид (0,56 г, 2,72 ммоль) и оставляли на 20 ч при 37° С. К реакционной смеси добавляли 10 мл воды, через 1 ч осадок отделяли, водный слой промывали смесью эфир — *n*-гексан, 1 : 3 (2×15 мл), упаривали досуха, упаривали с 10 мл этанола, вносили 30 мл насыщенного при 0° С аммиака в метаноле и оставляли на 24 ч при 20° С. Реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 75 мл воды и наносили на колонку (8×25 см) с целлюлозой DE-32 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Вещества элюировали NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (линейный градиент от 0 до 0,1 М, 10 л, рН 7,5). Фракцию, здесь и далее поглощающую при 254 нм, выходящую при концентрации бикарбоната аммония 0,072 М, упаривали досуха, переупаривали с водой (10×15 мл) и лиофильно высушивали. Выход азидо (Iж) 120 мг (67%).

К раствору 100 мг (0,16 ммоль) полученного вещества (Iи) в 3 мл пиридина и 1,5 мл 25% NH<sub>4</sub>OH прибавляли 200 мг Rh<sub>3</sub>P и смесь перемешивали 6 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали досуха, упаривали с 2 мл толуола, добавляли 20 мл воды и 20 мл эфира, водный слой отделяли, промывали эфиром (2×20 мл) и лиофильно высушивали. Выход соединения (Iж) 90 мг (97%).

*3'-Дезоксицитидин-3'-аминофосфорил-(3' → 5')-(3'-дезоксидезокси-3'-азидо)-аденозин (Iг)*. К суспензии 3'-дезоксидезокси-3'-азидоаденозин-5'-фосфата (H<sup>+</sup>-форма) (186 мг, 0,50 ммоль) в 5 мл диметилформамида (ДМФА) вносили N,N'-карбонилдиимидазол (400 мг, 2,5 ммоль), перемешивали 1 ч при 20° С, к смеси добавляли 1 мл метанола, через 30 мин метанол упаривали, прибавляли 242 мг (1 ммоль) 3'-дезоксидезокси-3'-аминоцитидина и смесь оставляли на 5 сут при 20° С. Реакционную массу упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку (5×25 см) с целлюлозой DE-32 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) и хроматографировали (линейный градиент концентрации от 0 до 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,062 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, упаривали досуха, остаток многократно упаривали с водой (10×15 мл) и лиофилизировали из воды. Выход 217 мг (71%).

*3'-Дезоксицитидин-3'-аминофосфорил-(3' → 5')-(3'-дезоксидезокси-3'-амино)-аденозин (Iв)*. К раствору 61,4 мг (0,1 ммоль) азидо (Iг) в 1,2 мл ДМФА и 0,8 мл 25% NH<sub>4</sub>OH добавляли 100 мг Rh<sub>3</sub>P и смесь перемешивали 16 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали досуха, к остатку прибавляли 15 мл воды и 15 мл эфира, водный слой промывали эфиром (2×10 мл) и лиофильно высушивали. Выход 57 мг (97%).

5'-фосфаты 3'-(*N*-метансульфонилглициламино)-3'-(дезоксиаденозина (Iв), 3'-(*N*-метансульфонилметиониламино)-3'-дезоксиаденозина (Iб) и 3'-(*N*-формилметиониламино)-3'-(дезоксиаденозина (Iа)). Раствор 114 мг (0,3 ммоль) 3'-деокси-3'-аминоаденозин-5'-фосфата (Iе) ( $\text{NH}_4^+$ -соль) в 5 мл воды наносили на колонку (2,5×6 см) с дауаксом 50×4 ( $\text{Pu}^+$ ), смолу промывали водой, вещество элюировали 200 мл 50% пиридина, к элюату добавляли 0,72 мл (0,3 ммоль) (*n*-Bu)<sub>3</sub>N, смесь упаривали досуха и упаривали с пиридином (2×10 мл) и ДМФА (10 мл). К суспензии полученного вещества в 5 мл ДМФ прибавляли имидазол (из 1,5 ммоль *N*-метансульфонилглицина, *N*-метансульфонил-*L*-метионина или *N*-формил-*L*-метионина и 1,5 ммоль *N,N'*-карбонилдимидазола в 5 мл ДМФА) и смесь перемешивали 25 ч при 20°С. К реакционной смеси прибавляли 10 мл 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , оставляли на 1 ч при 20°С и смесь упаривали досуха. Остаток в 50 мл воды наносили на колонку (5×25 см) с целлюлозой DE-32 ( $\text{HCO}_3^-$ ), элюцию проводили  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (линейный градиент от 0,01 до 0,2 М, 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,12–0,13 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , упаривали досуха, остаток многократно упаривали с водой (10×10 мл) и лиофилизировали. Выход соединений (Iв), (Iб) и (Iа) 92 мг (61,6%), 75 мг (43,5%) и 73 мг (45,2%) соответственно.

Цитидил-3' → 5'-3'-деокси-3'-(*N*-формил-*L*-метиониламино)аденозин (Iе) и 3'-деоксицитидил-3'-амидофосфорил-3' → 5'-3'-деокси-3'-(*N*-метансульфонил-*L*-метиониламино)аденозин (IIа). К суспензии 0,05 ммоль динуклеозидфосфата (Iж) или (IIв) в 0,5 мл ДМФА добавляли раствор 0,25 ммоль *N*-метансульфонил-*L*-метионил-*N*-имидазола в 1 мл ДМФА и смесь перемешивали 10 ч при 20°С. К реакционной массе приливали 1 мл 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , оставляли на 3 ч при 20°С, упаривали досуха, остаток в 25 мл воды наносили на колонку (5×25 см) с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ) и хроматографировали (линейный градиент от 0 до 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,062–0,065 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , упаривали досуха, остаток упаривали с водой (10×5 мл) и лиофильно высушивали. Выход соединения (Iг) 22 мг (61%), соединения (IIа) – 22,5 мг (63%).

Цитидил-3' → 5'-цитидил-3' → 5'-3'-деокси-3'-(*N*-метансульфонил-<sup>14</sup>C)лейциламино)аденозин [<sup>14</sup>C] (Iд). К раствору *N*-метансульфонил-*L*-[<sup>14</sup>C]лейцина (7,5·10<sup>8</sup> имп/мин) в 0,4 мл ДМФА прибавляли 3 мг *N,N'*-карбонилдимидазола и через 15 мин к смеси приливали 0,4 мл водного раствора, содержащего 90 ОЕ<sub>260</sub> соединения (Iз), синтез которого описан ранее [5]. К реакционной смеси добавляли 40 мкл насыщенного буфера  $\text{NaHCO}_3$ – $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , рН 9,0, перемешивали 2 ч при 20°С и наносили на Ватман 3 ММ (15×15 см). Хроматографию проводили в системе А. Зону с радиоактивным веществом (*R<sub>f</sub>* 0,3) элюировали водой и раствор упаривали досуха. Выход 3·10<sup>7</sup> имп/мин (3%).

3'-Дезоксицитидин-3'-амидофосфорил-3' → 5'-3'-деокси-3'-аминоцитидин (IIе). К раствору 3'-деокси-3'-аминоцитидина (97 мг, 0,40 ммоль) и 3'-деокси-3'-азидоцитидин-5'-фосфата (*H*<sup>+</sup>-форма) (70 мг, 0,20 ммоль) в 3 мл воды добавляли 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (383 мг, 20 ммоль) и перемешивали 4 ч при 25°С. К реакционной смеси добавляли 100 мл воды и наносили на колонку (5×25 см) с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ). Элюцию проводили  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (линейный градиент от 0 до 0,1 М, 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,039–0,041 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , собирали, упаривали досуха, остаток упаривали с водой (10×15 мл) и лиофилизировали. Выход азиды (II) 98 мг (82%).

К раствору 30 мг (0,15 ммоль) азиды (II) в 3 мл пиридина и 3 мл 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  прибавляли 118 мг (0,45 ммоль)  $\text{Ph}_3\text{P}$  и смесь перемешивали 6 ч при 20°С. Реакционную массу упаривали досуха, упаривали с 10 мл толуола, добавляли 20 мл воды и 20 мл эфира, водный слой отделяли, промывали эфиром (3×20 мл) и лиофилизировали. Выход 82 мг (95%).

*3'-Дезоксицитидин-3'-амидофосфорил-(3' → 5')-3'-дезокситидин-3'-амидофосфорил-(3' → 5')-3'-деокси-3'-(N-формил-L-метионилимидо)аденозин (IIб)*. К раствору 45 мг (0,80 ммоль) аналога (IIд) (Na<sup>+</sup>-соль) и 20 мг (0,40 ммоль) соединения (Iа) (H<sup>+</sup>-форма) в 1,5 мл воды добавляли 77 мг (4,0 ммоль) хлоргидрата 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и перемешивали 4 ч при 25° С. К реакционной смеси добавляли 100 мл воды и наносили на колонку (5×25 см) с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Элюцию проводили NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (линейный градиент от 0 до 0,2 М, 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,115–0,123 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, собирали, упаривали досуха, остаток упаривали с водой (10×15 мл), растворяли в воде (50 мл) и повторно хроматографировали на колонке (5×25 см) с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Элюцию проводили NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (линейный градиент от 0,07 до 0,17 М, 7,5 л, рН 7,5). Фракцию, выходящую при 0,090–0,095 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, собирали, упаривали досуха, многократно упаривали с водой (10×15 мл) и лиофильно высушивали. Выход 12 мг (28%).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ozols A. M., Azhayev A. V., Krayevsky A. A., Ushakov A. S., Gnuchev N. V., Gottikh B. P. (1980) Synthesis, in press.
2. Куханова М. К., Краевский А. А., Готтих Б. П. (1977) Молекулярн. биология, 11, 1357–1376.
3. Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. (1979) Progr. Nucl. Acid Research and Mol. Biol., 33, 1–56.
4. Azhayev A. V., Popovkina S. V., Tarusova N. B., Kirpichnikov M. P., Florentev V. L., Krayevsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. (1978) Nucl. Acids Res., 4, 2223–2234.
5. Azhayev A. V., Ozols A. M., Bushnev A. S., Dyatkina N. B., Kochetkova S. V., Kukhanova M. K., Victorova L. S., Krayevsky A. A., Gottikh B. P. (1979) Nucl. Acids Res., 5, 624–640.
6. Azhayev A. V., Krayevsky A. A., Smrt J. (1978) Collect. Czech. Chem. Commun., 43, 1647–1654.
7. Lormann R., Khorana H. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 4188–4194.
8. Azhayev A. V., Krayevsky A. A., Smrt J. (1979) Collect. Czech. Chem. Commun., 44, 447–493.
9. Morr M. (1976) Tetrahedron Lett., 2127–2128.
10. Morr M., Ludger E. (1978) Chem., Ber., 111, 2152–2172.
11. Kukhanova M., Streltsov S., Victorova L., Azhayev A., Gottikh B., Krayevsky A. (1979) FEBS Lett., 102, 198–203.
12. Streltsov S., Kosenjuk A., Kukhanova M., Krayevsky A., Gottikh B. (1979) FEBS Lett., 104, 279–283.
13. Ulbrich B., Mertens G., Nierhaus K. (1978) Arch. Biochem. and Biophys., 190, 149–154.
14. Lessard J. L., Pestka S. (1972) J. Mol. Biol., 274, 6909–6912.

Поступила в редакцию  
14.XII.1979

#### AMINONUCLEOSIDES AND THEIR DERIVATIVES. VIII. INHIBITORS OF THE DONOR SITE OF THE RIBOSOMAL PEPTIDYLTRANSFERASE CENTER: SYNTHESIS AND IN VITRO STUDIES

OZOLS A. M., KOSENYUK A. V., DYATKINA N. B., ATRAZHEV A. M.,  
AZHAYEV A. V., KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A., GOTTIKH B. P., SMRT J.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy  
of Sciences, Prague*

A method for the synthesis of competitive inhibitors of donor substrates of the ribosomal peptidyltransferase center has been developed. The basic structural unit of the inhibitors binding to the donor site with dissociation constant equal to  $\sim 10^{-3}$  M is 3'-deoxy-3'-(N-acyl aminoacylamido)adenosine 5'-phosphate. The synthesis of this type



of compounds is achieved by condensation of 3'-deoxy-3'-aminoadenosine 5'-phosphates with N-(acylaminoacyl)-imidazoles. Introduction of either cytidylic or 3'-deoxy-3'-amino-cytidylic residues to the 5'-position of 3'-deoxy-3'-(N-acyl aminoacylamido)adenosine 5'-phosphate increases the binding constant by 1-2 orders of magnitude, addition of the CpC-fragment — by 3 orders of magnitude. Synthesis of phosphoamide analogs of dinucleoside phosphates or trinucleoside diphosphates is carried out either by stepwise condensation of 3'-deoxy-3'-aminonucleosides and 3'-deoxy-3'-azidonucleoside 5'-phosphates activated with N,N'-carbonyldiimidazole, or the direct condensation of the components of the synthesis in aqueous media in the presence of water-soluble carbodiimide. Michaelis constants ( $K_m$ ) and inhibition constants ( $K_i$ ) for the above-mentioned compounds are also determined.

---