



УДК 542.91:547.853:547.963.3

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ФОСФОАМИДНОЙ СВЯЗИ
В УСЛОВИЯХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО СИНТЕЗА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АНИЛИДНОЙ ЗАЩИТЫ *

*Вадашкева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.,
Шубина Т. Н.*

*Институт органической химии Академии наук СССР
Сибирского отделения, Новосибирск*

Методом импульсной спектроскопии ЯМР на ядрах ^{31}P исследована лабильность фосфоамидной связи в анилидах $\text{dPhNHrC}^{\text{an}}$ и $\text{dPhNHrC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ в условиях олигонуклеотидного синтеза с использованием триизопропилбензолсульфохлорида в качестве конденсирующего агента. Показано, что проведение реакции в присутствии триизопропилбензолсульфокислоты или пиридинийхлорида в сухом пиридине способствует побочной реакции превращения соответствующих анилидов в симметричные пирофосфаты. Установлено, что добавление безводного триэтиламина к реакционной смеси приводит к стабилизации анилидной защиты. Показано, что 3'-О-ацетилнуклеозид-5'-метафосфат, полученный из $\text{drA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ предварительной активацией последнего триизопропилбензолсульфохлоридом, не претерпевает изменений в присутствии ТЭА. Осуществлен синтез защищенного тринуклеотида $\text{dPhNHrC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}\text{rA}^{\text{bz}}$ из $\text{dPhN}\cdot\text{HrC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ и $\text{drA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ в присутствии ТЭА и триизопропилбензолсульфохлорида как конденсирующего агента.

Среди методов, применяемых для защиты 5'-фосфатной группы нуклеотида при химическом синтезе олигодезоксирибонуклеотидов, большой интерес представляет блокирование 5'-фосфатной группы путем образования фосфоамидов. Предложен ряд амидных защит: анилидная [1, 2], *n*-броманилидная [3], *n*-(трифенилметил)-анилидная [4] 3-(*N,N*-диэтиламинометил)-анилидная [5]. Преимуществом таких защит, по сравнению с наиболее широко используемой цианэтильной, является их стабильность в условиях удаления 3'-ацетильной группы на промежуточных стадиях олигонуклеотидного синтеза.

Однако при применении в качестве конденсирующих реагентов арилсульфохлоридов пиридинийхлорид и пиридинийарилсульфонат, образующиеся в реакционной смеси, могут привести к разрушению фосфоамидной связи, аналогично тому, как это было обнаружено при исследовании действия ряда кислот на аденозин-5'-фосфоморфолидат [6].

* Сокращения: ТПС — триизопропилбензолсульфохлорид, ТПС-кислота — триизопропилбензолсульфокислота, ТЭА — триэтиламин. Остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC — JUB (1971) *J. Mol. Biol.*, 55, 299, например, drT-OAc — 3'-ацетилдезокситимидин-5'-фосфат, $\text{dPhNHrC}^{\text{an}}$ — N^4 -анилилдезоксицитидин-5'-фенилфосфамид, $\text{drA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ — 3'-ацетил- N^6 -бензоилдезоксаденозин-5'-фосфат.

В связи с этим мы исследовали лабильность фосфоамидной связи в анилидах в условиях олигонуклеотидного синтеза и предприняли поиски путей ее стабилизации.

Устойчивость анилидной защиты была нами изучена на примере анилидов моно- и динуклеотида $dPhNHpC^{an}$ и $dPhNHpC^{an}pC^{an}$ с применением метода импульсной спектроскопии ЯМР на ядрах ^{31}P . Спектр ЯМР $dPhNHpC^{an}$ приведен на рис. 1, а. Сигнал амидного атома фосфора (P_N) представляет собой синглет с δ 0,28 м. д. В спектре ЯМР $dPhNHpC^{an}pC^{an}$ надежно различаются сигналы межнуклеотидного атома фосфора (P_M) и амидного атома фосфора, представляющие собой синглеты с δ 1,8 м. д. и δ 0,68 м. д. соответственно (см. рис. 2, а). Спектры ЯМР изучаемых анилидов содержат также слабые сигналы 5'-концевого фосфата, что обусловлено примесью в этих соединениях небольших количеств соответственно моно- и динуклеотида.

Поскольку мы исследовали типичные условия олигонуклеотидного синтеза (4-кратный избыток нуклеотидного компонента и 8-кратный избыток ТПС по отношению к нуклеозидному компоненту), в экспериментах использовали 8-кратный избыток ТПС-кислоты или пиридинийхлорида в расчете на анилид. На рис. 1, б, в приведены спектры ЯМР реакционной смеси, содержащей $dPhNHpC^{an}$ и 8-кратный избыток ТПС-кислоты в сухом пиридине соответственно через 3,5 и 20 ч после начала реакции. Из спектра видно, что интенсивность сигнала P_N падает, незначительно возрастает (до 7% за 20 ч) интенсивность сигнала концевого атома фосфора (δ —0,42 м. д.) и появляется синглетный сигнал с δ 10,6 м. д. в пирофосфатной области [7]. Анализ с помощью БХ показывает, что в реакционной смеси присутствует соединение, совпадающее по величине R_f с заведомым пирофосфатом $d-O(pC^{an})_2$. Совокупность результатов ЯМР и БХ указывает на то, что в исследуемой реакционной смеси накапливается пирофосфат $d-O(pC^{an})_2$. По данным ЯМР за 3,5 ч в реакционной смеси накапливается 16% пирофосфата, а за 20 ч — 30% (от общего количества ^{31}P).

При действии на $dPhNHpC^{an}pC^{an}$ -8-кратного избытка ТПС-кислоты в сухом пиридине в реакционной смеси через 20 ч по данным спектров ЯМР образуется до 30% симметричного пирофосфата $d-O(pC^{an}pC^{an})_2$ с δ 10,5 м. д. и практически не изменяется интенсивность сигнала концевого атома фосфора (см. рис. 2, б). Выдерживание $dPhNHpC^{an}pC^{an}$ с 8-кратным избытком пиридинийхлорида в сухом пиридине в течение 20 ч приводит к появлению в реакционной смеси до 20% симметричного пирофосфата.

Таким образом, присутствие пиридинийхлорида и пиридинийарилсульфоната вызывает частичное разрушение фосфоамидной связи и приводит к превращению анилидов в симметричные пирофосфаты. Полученные данные согласуются с результатами работы [6] по действию кислот на аденозин-5'-фосфоморфолидат.

Очевидно, превращение анилидов моно- и олигонуклеотидов в симметричные пирофосфаты предполагает наличие в реакционной среде определенных количеств воды.

При более тщательном высушивании растворителя побочную реакцию образования пирофосфатов, по-видимому, можно свести к минимуму.

Накопление пирофосфата в присутствии кислот, возможно, обусловлено тем, что образующаяся протонированная форма анилида, обладая фосфорилирующими свойствами, способна реагировать со свободной 5'-фосфатной группой нуклеотида, который может накапливаться в реакционной смеси за счет имеющихся в пиридине следов воды. Однако анализ результатов нашей работы показал, что такой механизм сомнителен. Слабый сигнал концевого атома фосфора, присутствующий в спектре исходного соединения на всем протяжении реакционного периода (\sim 20 ч) или не изменяется (рис. 2), или даже немного увеличивается (рис. 1).

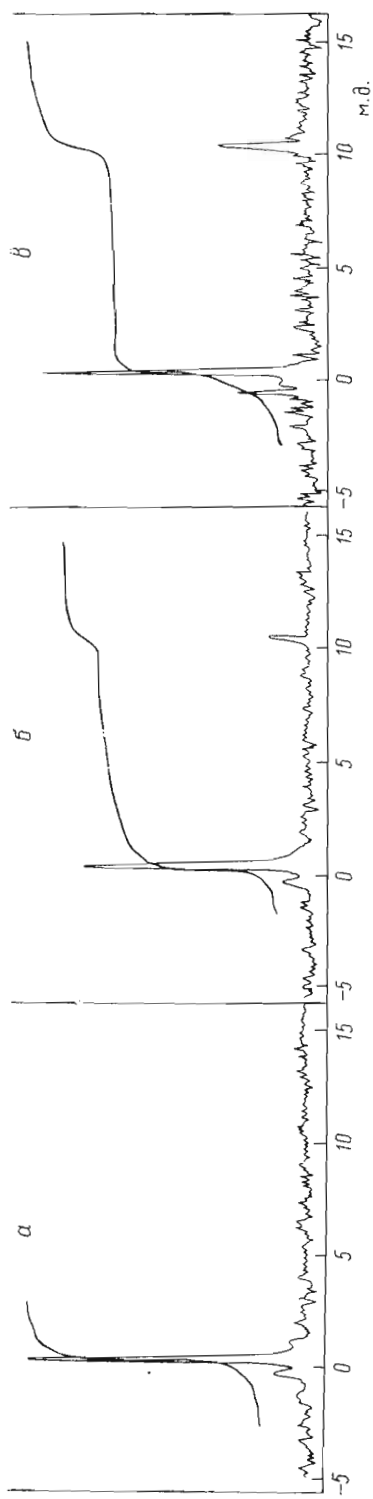


Рис. 1

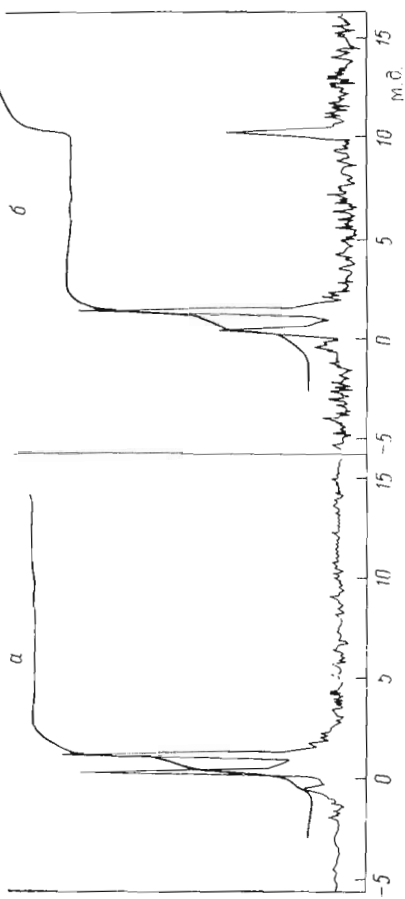


Рис. 2

Рис. 1. Спектры зр-ЯМР:
 а — $dPhNHrC^{an}$; б — $0,057M$
 $dPhNHrC^{an} + 8$ экв. ТПС-кис-
 лоты; в — $0,057M$ $dPhNHrC^{an} +$
 $+ 8$ экв. ТПС-кислоты

Рис. 2. Спектры зр-ЯМР: а —
 $dPhNHrC^{an}$ рС^{an}; б — $0,035M$
 $dPhNHrC^{an}$ рС<sup>an} + 8 экв. ТПС-
 кислоты</sup>

Можно предположить также, что накопление симметричного пирофосфата связано с тем, что протонированная форма анилида взаимодействует с исходной молекулой анилида с последующим быстрым гидролизом неустойчивого в кислой среде анилида пирофосфата.

Мы попытались подавить вызываемые кислотами превращения добавлением безводного ТЭА в реакционную среду. На наш взгляд, такой

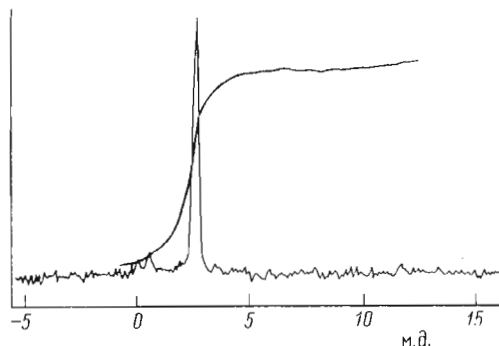
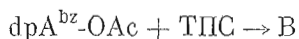


Рис. 3. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси 0,057М $\text{dPhNHpC}^{\text{an}} + 8$ экв. ТПС-кислоты + 10 экв. ТЭА

способ устранения побочных процессов представляется нам более эффективным. Для этого смеси, содержащие анилид и ТПС-кислоту или анилид и пиридинийхлорид, выдерживали с 10-кратным избытком ТЭА (по отношению к анилиду) в течение суток. По данным ЯМР в присутствии ТЭА в смеси $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}$ с ТПС-кислотой не происходит каких-либо превращений анилида (см. рис. 3, спектр записан через 20 ч после смешивания; в присутствии ТЭА сигнал P_N смещается в сильное поле на 2,5 м.д.). Аналогичный результат наблюдали также при добавлении ТЭА к смеси, содержащей пиридинийхлорид при выдерживании в течение суток. На основании полученных данных представлялось целесообразным проведение олигонуклеотидного синтеза, исходя из анилида с добавлением ТЭА к реакционной смеси. Поскольку при синтезе предполагали использовать предварительную активацию нуклеотидного компонента, важно было выяснить поведение образующегося при этом активного производного (соединения В) [7] в присутствии ТЭА. Для этого сравнивали спектр соединения В, полученного из dpT-OAc действием 1,5 экв. ТПС до и после добавления к нему ТЭА (2 экв. по отношению к ТПС). Спектр ЯМР соединения В после добавления ТЭА практически не изменялся.

Синтез анилида тринуклеотида в присутствии ТЭА был осуществлен по следующей схеме:



Вначале получали соединение В из $\text{dpA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ действием ТПС, затем к нему добавляли $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ и 2-кратный по отношению к ТПС избыток ТЭА. Исходный анилид динуклеотида $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ получали по аналогии с анилидом $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}$ [3]. На рис. 4 приведен профиль хроматографического разделения реакционной смеси. Пик III содержит $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}\text{pA}^{\text{bz}}$, выход продукта после хроматографии — 37% (с учетом потерь при выделении). Строение полученного анилида подтверж-

дено УФ-спектральными характеристиками, данными БХ, а также ферментативным гидролизом тринуклеотида $d\text{pCpCpA}$, полученного после удаления анилидной защиты и N-защитных групп с $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}\text{pA}^{\text{bz}}$, фосфодиэстеразой змеиного яда и фосфомоноэстеразой из *E. coli*.

Следует отметить, что проведение синтеза анилида тринуклеотида в отсутствие ТЭА, как правило, приводило к более сложному составу реак-

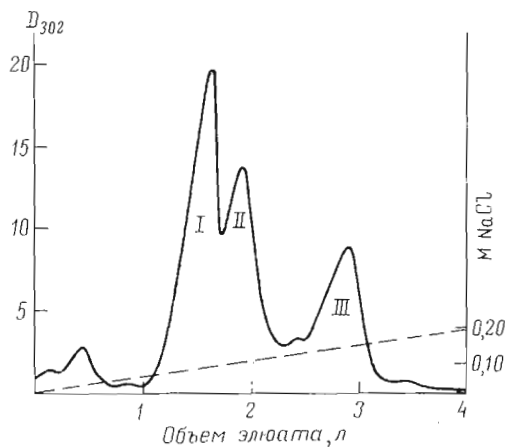


Рис. 4. Выделение $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}\text{pA}^{\text{bz}}$. Хроматография на колонке с DEAE-молселектом А-25 (Cl^- , $2,0 \times 36$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl ($0 \rightarrow 0,2$ М) в $0,01$ М трис- HCl (pH 7,5) — 7 М мочеваине (объем смесителя и резервуара по 2 л), скорость элюции 24 мл/ч, объем фракции $7,5$ мл

ционной смеси, при хроматографическом разделении которой обнаруживали значительные количества симметричного пирофосфата $d\text{-O}(\text{pC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}})_2$ ($\sim 40\%$), в то время как выход основного продукта был крайне низким ($\sim 10\%$).

Экспериментальная часть

В работе использовали $5'$ -дезоксирибомононуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР. N-ацилдезоксинуклеозид- $5'$ -фосфаты, $d\text{pC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ синтезировали согласно [8], $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}$ получен по методу [3] и выделен после колоночной хроматографии на DEAE-молселекте А-25, «Reanal» (Венгрия). ТПС-кислота получена гидролизом ТПС, пиридинийхлорид получен по методике [9]. В экспериментах использовали пиридин, перегнанный над KOH и затем над P_2O_5 в содержащий не больше $0,02\%$ влаги.

БХ проводили на бумаге FN-3 в следующих системах растворителей: $\text{EtOH}-\text{IMAсONH}_4$, $7:3$, pH 7,5 (I) и $n\text{-PrOH}-\text{конц. NH}_4\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$, $55:10:35$ (II). УФ-спектры снимали в нейтральных водных растворах на спектрофотометре СФ-16. Микроколоночную ионообменную хроматографию выполняли в системе Томлинсона — Тенера [10] с использованием прибора МКСФП-1.

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на спектрофотометре НХ-90 с Фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (фирма «Bruker-Physic AG», ФРГ) на частоте $36,43$ МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% -ной H_3PO_4 в качестве внешнего стандарта. Количественный анализ результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей по всему спектру. Большинство спектров записано с гетероядерным подавлением спин-спиновой

связи ^{31}P — ^1H . Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Концентрации $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}$ и $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ составляли соответственно 0,057 и 0,035 М. Реакцию проводили при комнатной температуре. Реакционные смеси готовили и переносили в ампулу в сухой камере. Ампулы с реакционными смесями хранили в эксикаторе над P_2O_5 .

$d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ 1,5 г (1,4 ммоль) триэтиламмонийной соли $dp\text{C}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ растворяли в 6 мл воды и 30 мл *трет*-бутанола, прибавляли 2,8 мл (30 ммоль) анилина и 2,9 г (14 ммоль) дициклогексилкарбодимида, выдерживали 5 ч при 70° и ночь при 20° . Конец реакции определяли с помощью БХ в системе I (для исходного $dp\text{C}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ R_f 0,38, для его анилида R_f 0,71), а также с помощью ионообменной микроколоночной хроматографии (пик анилида выходит при концентрации NaCl 0,05 М). Реакционную смесь упарили, остаток растворили в 15 мл 50%-ного водного пиридина, проэкстрагировали гексаном (3×40 мл). Добавили равный объем воды, отфильтровали дициклогексилмочевину, фильтрат пропустили через колонку с дауэком 50×2 (пиридиновая форма $1,8 \times 24$ см) и хроматографировали на ДЕАЕ-молселекте А-25 (Cl^- , $2,9 \times 27$ см) с использованием линейного градиента концентраций NaCl ($0 \rightarrow 0,25$ М) в 0,01М трис- HCl (рН 7,5) и 7М мочеvine, объем смесителя и резервуара по 4 л. Анилид динуклеотида элюировали при концентрации NaCl 0,09 М, исходный динуклеотид — при концентрации 0,11М, вещество неустановленного строения — при 0,06М. После обессоливания на ДЕАЕ-целлюлозе (HCO_3^-) и осаждения эфиром из пиридина выход анилида 0,63 г (40%), $R_{\text{дрт}}$ 1,61 (система I), $\lambda_{\text{макс}}$ 302 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 248 нм. При действии на анилид $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ конц. NH_4OH (3 ч при 50°) получен $d\text{PhNHpCpC}$, $R_{\text{дрт}}$ 0,97 (система I), $\lambda_{\text{макс}}$ 272,231 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 251,224 нм. При гидролизе этого вещества фосфодиэстеразой змеиного яда получены $d\text{PhNHpC}$ и $dp\text{C}$ в отношении 1,05 : 1,00.

$d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}p\text{A}^{\text{bz}}$. Раствор 520 мг (0,93 ммоль) пиридиновой соли $dp\text{A}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ и 420 мг (1,4 ммоль) ТПС в 5 мл сухого пиридина выдерживали 8 ч. при комнатной температуре, затем прибавили 180 мг (0,156 ммоль) триэтиламмонийной соли $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$ в 3 мл сухого пиридина, 0,4 мл (2,8 ммоль) безводного ТЭА и оставили на 10 ч при комнатной температуре. К реакционной смеси при охлаждении добавили 0,2 мл 1М раствора ТЭА в пиридине, 11 мл воды и оставили на 12 ч. Затем при 0° смешали с равным объемом 2н. NaOH , выдерживали 10 мин при 0° , нейтрализовали до рН 8 дауэком 50×2 (пиридиновая форма), смолу отфильтровывали и промывали 20%-ным водным пиридином. Фильтрат упаривали с добавлением *n*-бутанола, остаток растворяли в 130 мл 0,01М трис- HCl (рН 7,5)—7М мочеvine и напосили на колонку с ДЕАЕ-молселектом А-25 (Cl^-). Условия хроматографии приведены на рис. 4. Из фракций 160—210 (пик I) выделили 10200 $\text{OE}_{280} dp\text{A}^{\text{bz}}$, из фракций 238—280 (пик II) выделили 2700 $\text{OE}_{302} d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}$, из фракций 338—405 (пик III) выделили 3140 $\text{OE}_{290} d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}p\text{A}^{\text{bz}}$. Выход анилида тринуклеотида — 37%. $R_{\text{дрт}}$ 1,36 (система I), $\lambda_{\text{макс}}$ 288 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 248 нм.

$d\text{PhNHpCpCpA}$ получали при действии конц. NH_4OH (3 ч. при 50°) на полностью защищенный тринуклеотид с последующим удалением NH_3 , упариванием в вакууме и хроматографией остатка на бумаге; $R_{\text{дрт}}$ 0,42 (система I), $\lambda_{\text{макс}}$ 265,234 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 246,225 нм.

$dp\text{C}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}p\text{A}^{\text{bz}}$ получали из $d\text{PhNHpC}^{\text{an}}p\text{C}^{\text{an}}p\text{A}^{\text{bz}}$ действием изоамильнитрата в смеси $\text{Pu} - \text{AcOH}$ (1 : 1) [3] и выделяли хроматографией на бумаге $R_{\text{дрт}}$ 0,8 (система I), $\lambda_{\text{макс}}$ 287, $\lambda_{\text{мин}}$ 250 нм. После аммонолиза из него получен $dp\text{CpCpA}$, $R_{\text{дрт}}$ 0,44 (система II), $\lambda_{\text{макс}}$ 265, $\lambda_{\text{мин}}$ 228 нм. Гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда приводит к $dp\text{C}$ и $dp\text{A}$ в отношении 2,07 : 1,00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ohtsuka E., Muraо K., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3441—3445.
2. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 5507—5510.
3. Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г. (1973) Химия природн. соединений, 410—417.
4. Agarwal K. L., Yamazaki A., Khorana H. G. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2754—2762.
5. Hata T., Nakagawa I., Takebayashi N. (1972) Tetrahedron Lett., 2931—2934.
6. Moffatt I. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649—658.
7. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1973) Докл. АН СССР, 242, 630—633.
8. Бадашкева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кнорре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) Химия природн. соединений, 394—402.
9. Физер Л., Физер М. (1970) Реагенты для органического синтеза, т. 3, стр. 115, «Мир», М.
10. Tomplinson R. V., Tener G. M. (1962) I. Amer. Chem. Soc., 84, 2644—2645.

Поступила в редакцию
10.IX.1974

INVESTIGATION OF THE STABILITY OF PHOSPHOAMIDE BOND IN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS WITH ANILIDE PROTECTION

BADASHKEJEVA A. G., ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G., SHUBINA T. N.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The lability of the phosphoamide bond was investigated by means of pulsed ^{31}P -NMR spectroscopy for two anilides, $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}$ and $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$, in oligonucleotide synthesis based on the use of triisopropylbenzenesulphonyl chloride as a condensing reagent. In the presence of triisopropylbenzenesulphonic acid or pyridinium chloride in dry pyridine, the anilides were shown to convert to symmetric pyrophosphates. The addition of dry triethylamine results in the stabilization of anilides. It has been shown that 3'-O-acetylnucleoside-5-methaphosphate, derived by the activation of $\text{dpA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ with triisopropylbenzenesulphonyl chloride, does not decompose in the presence of triethylamine. A protected trinucleotide $\text{dPhNHpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}\text{pA}^{\text{bz}}$ has been synthesized starting from $\text{dPhNHpCpC}^{\text{an}}\text{pC}^{\text{an}}$ and $\text{dpA}^{\text{bz}}\text{-OAc}$ in the presence of triethylamine and triisopropylbenzenesulphonyl chloride as a condensing reagent.