



УДК 547.963.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНГИДРИДОВ И ГАЛОГЕНАНГИДРИДОВ ТРИГАЛОГЕНУКСУСНЫХ КИСЛОТ С ТИМИДИН-5'-ФОСФАТОМ: ПУТЬ К НОВЫМ АКТИВИРУЮЩИМ РЕАГЕНТАМ В РЕАКЦИЯХ ФОСФОРИЛОВАНИЯ ДЛЯ НУКЛЕОТИДОВ

© 2003 г. В. С. Богачев[#], П. А. УлановНовосибирский институт биоорганической химии,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 05.02.2001 г. Принята к печати 12.03.2002 г.

Изучено взаимодействие тимидин-5'-фосфата (рТ) с ангидридом и хлорангидридом трихлоруксусной и бромангидридом трибромуксусной кислот в DMF и CH₃CN в присутствии третичных аминов. Показано, что в первых двух реакциях основной продукт – смешанный ангидрид трихлоруксусной и тимидиловой кислот (ацилфосфат), наряду с которым образуется P¹, P²-дитимидин-5'-пирофосфат. Взаимодействие бромангидрида трибромуксусной кислоты и рТ протекает по более сложному механизму с образованием преимущественно замещенных полифосфатов. Обработка полученных реакционных смесей морфолином с высоким выходом приводит к фосфоморфолиду рТ. Фосфорилирующая активность трихлорацетил- и трибромацетилфосфатов соответствует 77 и 89%.

Ключевые слова: ацилфосфаты, тимидин; фосфорилирование; тригалогенуксусный ангидрид; галогенангидрид.

ВВЕДЕНИЕ

Наш интерес к ангидридам сильных карбоновых кислот обусловлен возможностью их применения в качестве активирующих реагентов для реакций фосфорилирования, в частности, для получения различных функциональных производных нуклеотидов [1, 2]. Ранее мы показали, что трифторуксусный ангидрид (ТФА) при взаимодействии с нуклеотидами образует смешанные ангидриды трифторуксусной и нуклеозид-5'-фосфорной кислот (ацилфосфаты, АР) [1], которые, подобно большинству АР [3–5], проявляют ацилирующие, а не фосфорилирующие свойства. Однако после их обработки нуклеофильными катализаторами типа *N*-метилимидазола (MeIm) или 4-(*N,N*-диметиламинопиперидина, способными в результате равновесных реакций превращать трифторацетильные АР в относительно стабильные цвиттер-ионные фосфамиды нуклеотидов, нам удалось с высоким выходом получить ряд производных нуклеотидов, в том числе dNTP [2], морфолид и

хлорфениловый эфир рТ [1]. Таким образом, использование остатка сильной карбоновой кислоты в качестве ацильного компонента АР и применение нуклеофильных катализаторов в реакции фосфорилирования можно рассматривать как эффективный способ увеличения фосфорилирующей активности АР.

В литературе описано несколько подходов к решению этой проблемы. Увеличение кислотности ацильного компонента АР для повышения его фосфорилирующей силы впервые предложено А. Тоддом [6, 7]. Он предположил, что введение остатка сильной кислоты (трифторуксусной) в АР может быть достаточным для появления у них фосфорилирующей активности. Проверив это предположение, А. Ламби [8] получил трифторацетилдиэтилфосфат и показал, что он не является фосфорилирующим агентом по отношению к аминам. Следовательно, одного увеличения кислотности ацильного компонента недостаточно для повышения фосфорилирующей активности ацилфосфатов. Основываясь на результатах Эмери и Голда [9], предложивших изменять направление нуклеофильной атаки в смешанных ангидридах карбоновых кислот введением объемных заместителей в один из ацильных остатков, Ламби исследовал фосфорилирующие свойства серии ацилдиэтилфосфатов, содержащих остатки триметил- и трифенилуксусной и полихлорбензойных кислот, в реакции с анилином. Анализ его данных привел к выводу, что наилучший результат до-

Сокращения: АР – ацилфосфат, смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот (или эфиров последней); (Bu₃N)₂рТ – бис-трибутиламониевая соль тимидин-5'-фосфорной кислоты; MeIm – *N*-метилимидазол; ТВВ – бромангидрид трибромуксусной кислоты; ТСА – ангидрид трихлоруксусной кислоты; ТФА – ангидрид трифторуксусной кислоты; %Р – доля общей интегральной интенсивности ³¹Р в ³¹Р-ЯМР-спектре, выраженная в процентах.

[#] Автор для переписки (тел.: (3832) 334710; факс: (3832) 334301; эл. почта: bogachev@inboch.ru).

стигается введением в состав ацильного компонента AP объемных электроноакцепторных заместителей, увеличивающих кислотность AP и создающих стерические затруднения для нуклеофильной атаки атома углерода карбонильной группы. Позднее с использованием подобного подхода были получены смешанные ангидриды мезитиленкарбоновой кислоты и нуклеотидов [10–12] и показано, что они проявляют только фосфорилирующую активность. Но реакционная способность таких AP была низкой, так как изменение стерического окружения C=O-группы было достигнуто введением в ацильный фрагмент электронодонорных метильных групп, существенно уменьшающих его электрофильность и, следовательно, активирующее влияние на атом фосфора нуклеотида.

В данной работе сообщается о результатах исследования взаимодействия производных трихлор- и трибромуксусной кислот с тимидин-5'-фосфорной кислотой (pT) и последующих реакций полученных ацилфосфатов с нуклеофилами. Выбор активирующих ацильных реагентов, помимо их чисто потребительской привлекательности (доступность, дешевизна и легкость получения) был обусловлен также возможностью исследования влияния изменения стерического окружения карбонильной группы ацильного фрагмента на фосфорилирующие свойства соответствующих AP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве модельной мы выбрали реакцию активных производных тригалогенуксусных кислот и $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT}$ в присутствии третичного амина (реакция ацилирования) при 22–25°C с последующей обработкой реакционной смеси избытком морфолина (реакция фосфорилирования). Ацилирование проводили в двух вариантах условий: в растворе в DMF и в виде суспензии в CH_3CN (см. “Эксперимент. часть”). Ход реакций контролировали при помощи ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, ионообменной МКХ и ТСХ. Результаты экспериментов представлены в табл. 1 и 2, на схеме приведена трактовка механизма изученных процессов.

Вначале мы исследовали взаимодействие pT и TSA. Было проведено несколько экспериментов (табл. 1, эксперименты 1–11). Отнесение полученных сигналов в ^{31}P -ЯМР-спектрах реакционных смесей проводили по данным обзоров [13, 14] и наших работ [1, 2], посвященных исследованию аналогичных реакций с участием TFA. В первом эксперименте (табл. 1) мы использовали дробное добавление TSA, чтобы выяснить его оптимальное количество для достижения максимального выхода AP. TSA добавляли двумя последовательными порциями (3 + 2 экв.) к раствору $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT}$ в DMF в присутствии Bu_3N (3 экв.), каждый раз анализируя реакцию с помощью ^{31}P -

ЯМР-спектроскопии. После первого добавления (эксперимент 1) превращение pT проходит на ~60% и дальнейших изменений спектра во времени практически не наблюдается. Полное исчезновение исходного pT (0.74 м.д., с) происходит лишь при повторном добавлении TSA.

В результате реакции (см. схему) зафиксировано образование смешанных ангидридов (IIa) (–8.03 м.д., с, 11 %P) и (IIб) (–8.31 м.д., с, 60 %P), а также P^1, P^2 -дитимидин-5'-пирофосфатов (Va, б) (–11.6 м.д., м, 12 %P). Кроме того, регистрируются два синглета – при –8.68 (7 %P) и –8.92 м.д. (10 %P). Эти сигналы мы отнесли к фосфорильным производным pT (IVa, б). Они проявляются в области спектра, характерной для AP, а при замене DMF на CH_3CN исчезают. При добавлении к исходной реакционной смеси 2 экв. формиата трибутиламмония происходит увеличение интенсивности этих сигналов до 38 %P, а при действии морфолина наблюдается их исчезновение (данные не приведены). Это служит косвенным подтверждением структуры соединений (IVa, б).

Образование двух типов ацилфосфатов (IIa, б) и (IVa, б) и пирофосфатов (Va, б), которым в ^{31}P -ЯМР-спектре отвечают две пары близко расположенных синглетов и мультиплет, можно объяснить неполным ацилированием 3'-ОН-групп остатка тимидина. При увеличении количества добавляемого TSA наблюдается снижение интенсивности слабополюсных сигналов в каждой из пар и повышение интенсивности синглетов, сдвинутых в сильное поле (табл. 1, эксперименты 1 и 1'), что позволяет отнести последние к 3'-O-ацилированным формам этих соединений. Важно отметить, что увеличение времени реакции (как и в случае ацилирования фосфатной группы) не приводит к повышению выхода целевых продуктов.

Далее реакционную смесь, содержащую AP (IIa, б), обрабатывали морфолином (20 экв., 2–3 мин), получая фосфоморфолиды (VIIa, б) (два синглета 5.59 м.д., 19 %P и 5.74 м.д., 18 %P), нуклеотиды (Ia, б) (48 %P) и пирофосфаты (Va, б) (15 %P) (табл. 1, эксперимент 5). Полное деблокирование 3'-ОН-групп в полученных соединениях происходит при действии аммиака (табл. 1, эксперимент 6) или при длительном выдерживании реакционной смеси в присутствии морфолина (данные не приведены). При этом в ^{31}P -ЯМР-спектре реакционной смеси остаются только слабополюсные сигналы из каждой пары, соответствующие соединениям (VIIa), (Ia) и (Va).

Полученные продукты были выделены ионообменной хроматографией и охарактеризованы данными УФ-, ^{31}P - и ^1H -ЯМР-спектроскопии в сравнении с контрольными образцами. Образование пирофосфатов (Va, б) в реакции ацилирования и морфолидов (VIIa, б) в реакции фосфорилирования свидетельствует о значительной фосфорилирующей активности (A_p) ацилфосфатов (IIa, б) в

Таблица 1. Данные ^{31}P -ЯМР-спектров исследованных реакционных смесей и условия их получения

№	Условия реакции	Химические сдвиги (δ , м.д.), %P и их отнесение	A_p , %
1.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TCA-Bu}_3\text{N} = 1 : 3 : 3$, растворитель – DMF	0.74, уш. с (39) (Ia, б); –7.87, с (24) и –8.14, с (13) (IIa) и (IIб); –8.52, с (10) и –8.78, с (5) (IVa) и (IVб); –11.50, м (9) (Va, б)	–
1'.	Реакция 1 + 2 экв. TCA, растворитель – DMF	–8.03, с (11) и –8.31, с (60) (IIa) и (IIб); –8.68, с (7) и –8.92, с (10) (IVa) и (IVб); –11.55, м (12) (Va, б)	–
2.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TCA-Bu}_3\text{N} = 1 : 6 : 5$, растворитель – DMF	–8.54, с (86) (IIб); –9.16, с (13) (IVб); –11.24, с (1) (Vб)	–
3.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TCA-Bu}_3\text{N} = 1 : 8 : 3$, растворитель – DMF	–9.69, с (25) и –9.83, с (55.5) (IIa) и (IIб); –10.39, с (3) и –10.51, с (4) (IVa) и (IVб); –13.10, м (6.5) (Va, б)	–
4.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TCA-Bu}_3\text{N} = 1 : 6 : 4$, растворитель – CH_3CN	–9.83, с (99) (IIб)	–
5.	Реакция 1' + 20 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.74, с (19) и 5.59, с (18) (VIIa) и (VIIб); 2.06, с (23) и 1.85, с (25) (Ia) и (Iб); –10.35, д (15) (Va)	52
6.	Реакция 5 + 20 экв. NH_4OH	6.37, с (37) (VIIa); 2.94, с (48) (Ia); –12.13, с (15) (Va)	–
7.	Реакция 2 + 15 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.56, с (25) и 5.40, с (30) (VIIa) и (VIIб); 1.91, с (18) и 1.71, с (23) (Ia) и (Iб); –10.46, м (4) (Va)	66
8.	Реакция 2 + 10 экв. MeIm, растворитель – DMF	–8.61, с (15) (IVб); –10.79, с (85) (VIб)	–
9.	Реакция 8 + 15 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.89, с (42) и 5.77, с (34) (VIIa) и (VIIб); 1.85, с (7) и 1.69, с (8) (Ia) и (Iб); –10.21, м (9) (Va)	–
10.	Реакция 3 + 15 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.02, с (20) и 5.59, с (38) (VIIa) и (VIIб); 2.06, с (13) и 1.85, с (22) (Ia) и (Iб); –10.35, д (7) (Va)	75
11.	Реакция 4 + 15 экв. морфолина, растворитель – CH_3CN	5.17, с (6) и 4.91, с (70) (VIIa) и (VIIб); 2.25, м (23) (Ia, б)	77
12.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TCC-Bu}_3\text{N} = 1 : 7 : 5$, растворитель – DMF	–8.21, с (99) (IIб)	–
13.	Реакция 12 + 15 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.29, с (46) и 5.21, с (23) (VIIa) и (VIIб); 1.39, уш. с (15) (Ia, б); –10.46, м (16) (Va, б)	77
14.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TBB-Bu}_3\text{N} = 1 : 5 : 5$, растворитель – DMF	–11.93, м (30) (Va, б); –19.27, м (10) (VIIIa, б, P¹, P³) и (IXa, б, P¹, P⁴); –23.97, м (41) (VIIIa, б, P²); –26.34, м (19) (IXa, б, P², P³)	–
15.	$(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{pT-TBB-Bu}_3\text{N} = 1 : 3 : 2$, растворитель – DMF	–8.95, с (2,5) и –9.33, с (6) (IIIa) и (IIIб); –12.01, м (38) (Va, б); –19.35, м (8) (VIIIa, б, P¹, P³) и (IXa, б, P¹, P⁴); –24.04, м (35) (<i>P</i> -ацил- VIIIa, б, P¹, P³); –26.25, м (10) (VIIIa, б, P²); (IXa, б, P², P³)	–
15'	Реакция 15 + 3 экв. TBB + 2 экв. Bu_3N , растворитель – DMF	–9.19, м (5); –11.75, м (11); –20.04, м (8); –24.46, м (32); –27.65, м (44)	–
16.	$\text{pT-TBB-Bu}_3\text{N} = 1 : 6 : 4$, растворитель – CH_3CN	–10.56, с (3) и –10.76, с (36) (IIIa) и (IIIб); –13.68, м (28) (Va, б) и (VIIIa, б, P¹, P³); –21.55, м (25) (<i>P</i> -ацил- VIIIa, б, P¹, P³); –28.35, м (7) (VIIIa, б, P²)	–
17.	Реакция 14 + 15 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.02, уш.с (29) (VIIa, б); 1.95, м (12) (Ia, б); –10.77, с (42) (Va, б); –11.56, м (11) (VIIIa, б, P¹, P³); –21.93, м (4) (VIIIa, б, P²); 7.55, с (2)	–
18.	Реакция 15' + 18 экв. морфолина, растворитель – DMF	5.09, с (2) и 4.91, с (20) (VIIa) и (VIIб); 1.79, м (2) (Ia, б); –10.92, уш. с (29) (Va, б); –11.45, д (14) (VIIIa, б, P¹, P³); –22.03, м (8) (VIIIa, б, P²); 7.34, с (4); –1.85, м (15); –3.02, д (5)	–
19.	Реакция 16 + 18 экв. морфолина, растворитель – CH_3CN	5.03, с (6) и 4.82, с (36) (VIIa) и (VIIб); 2.66, с и 2.44, с (4.6) (Ia) и (Iб); –11.02, м, (37) (Va, б); –12.18, м (2) (VIIIa, б, P¹, P³); –22.07, м (1) (VIIIa, б, P²); 7.4, с (7); –1.45, м (4); –2.72, м (3)	89

Таблица 2. Химические сдвиги (δ , м.д.) соединений (I)–(IX)

Соединение	^{31}P -ЯМР-спектр
(Ia, б)	2.6, с – (–0.9, с) ¹⁾
(IIa, б), (IIIa, б)	–7.87, с; –8.14, с; –8.95, с; –9.33, с
(IVa, б), (CH ₃ CO)рТ	–8.67, с; –8.78, с; –9.52, с
(Va, б), (VIb), (VIIa, б)	–11.6, м; –10.79, с; 5.56, с; 5.40, с
(VIIIa, б)	–11.93, м (P^1, P^3), –23.97, м (P^2) ²⁾
(IXa, б)	–11.93, м (P^1, P^4); –26.35, м (P^2, P^3) ²⁾

¹⁾ Положение сигнала сильно зависит от pH среды; ²⁾ приведено приблизительное значение ввиду сложной картины этого участка спектра.

этих процессах. Под величиной A_p здесь и далее мы будем понимать фосфорилирующую активность AP, составляющую вместе с ацилирующей активностью (A_a) его общую реакционную способность $A = A_p + A_a = 100\%$ в реакции фосфорилирования. Количественно A_p можно определить как суммарный выход фосфорилированных продуктов, образующихся при взаимодействии AP с присутствующими в реакционной смеси нуклеофилами (в нашем случае – с морфолином и рТ).

Далее мы исследовали возможность увеличения фосфорилирующей активности AP (IIa, б) путем обработки их нуклеофильным катализатором – *N*-метилимидазолом (MeIm). Для получения ацилфосфатов (IIa, б) к раствору рТ (1 экв.) и Bu₃N (5 экв.) в DMF прибавляли 6 экв. TCA в один прием (табл. 1, эксперимент 2). Этот вариант проведения реакции оказался более эффективным по сравнению с дробным добавлением ацилирующего реагента. Через 2–3 мин реакционная смесь содержала два основных продукта – трихлорацетилфосфат (IIб) (86 %P), предполагаемый формилфосфат (IVб) (13 %P) и лишь следы пирофосфата (Vб) (<1 %P). Полученную смесь делили на две части и к одной из них добавляли морфолин (15 экв.), а к другой – MeIm (10 экв.) (табл. 1, эксперименты 7 и 8). В первом случае получали морфолиды (VIIa, б) (55 %P), нуклеотиды (Ia, б) (41 %P) и пирофосфаты (Va, б) (4 %P). Ацилфосфат (IIб) расходуется здесь как на образование морфолида (64%), так и пирофосфата (2%), поэтому его фосфорилирующая активность составляет $A_p = (64 + 2) = 66\%$.

Во втором случае, после обработки реакционной смеси MeIm, наблюдается почти количественное превращение ацилфосфата (IIб) в имидазolid (VIб) (синглет –10.79 м.д., 85 %P). Сигнал формилфосфата (IVб) при этом практически не изменяется. Фосфоацетилтимидин (синглет –9.52 м.д.), полученный в контрольном эксперименте реакцией

рТ с уксусным ангидридом (6 экв.) и Bu₃N (3 экв.), в реакции с MeIm был также неактивным. Обработка морфолином реакционной смеси, содержащей метилимидазolid (VIб) (табл. 1, эксперимент 9), дает морфолиды (VIIa, б) (76 %P), нуклеотиды (Ia, б) (15 %P) и пирофосфаты (Va, б) (9 %P). Выход морфолида составил 90% в расчете на исходный AP.

С учетом полученных результатов по оптимизации проведения реакции (см. “Обсуждение результатов”), мы провели еще два эксперимента по ацилированию рТ (раствор в DMF готовили по второму варианту, см. “Эксперимент. часть”) с соотношением эквивалентов рТ–TCA–Bu₃N как 1 : 8 : 3 в DMF и 1 : 6 : 3 в CH₃CN. В первом опыте содержание формилфосфатов (IVa, б) и пирофосфатов (Va, б) в реакционной смеси составило 7 и 6.5 %P соответственно, а выход морфолидов (VIIa, б) – 72% (A_p 75%) (табл. 1, эксперименты 3 и 10). Во втором варианте был достигнут лучший результат в этой серии: выход AP (IIб) – 99%, а морфолидов (VIIa, б) – ~77% (A_p 77%) (табл. 1, эксперименты 4 и 11).

Исследование реакции TCC и рТ проводили только в DMF, так как в CH₃CN наблюдалось образование осадка, вероятно, ацилтрибутиламмониевого комплекса, и выход AP (IIб) был низким. Обработка раствора (Bu₃NH)₂рТ в DMF двумя последовательными порциями TCC (5 + 2 экв.) в присутствии 5 экв. Bu₃N приводит к образованию смешанного ангидрида (IIб) (99 %P) (табл. 1, эксперимент 12). Наблюдаются только следы формильного производного (IVб) и пирофосфата (Vб). После обработки реакционной смеси 15 экв. морфолина образуются морфолиды (VIIa, б) (69 %P), нуклеотиды (Ia, б) (15 %P) и пирофосфаты (Va, б) (16 %P) (табл. 1, эксперимент 13). Выход морфолидов (VIIa, б) в данном случае составил ~69%, а фосфорилирующая активность с учетом расхода AP на взаимодействие с рТ – $A_p = 69 + 8 = 77\%$, что совпадает с этим параметром, определенным в реакции рТ и TCA.

Далее мы провели исследование взаимодействия рТ и ТВВ. При добавлении трибутиламина и ТВВ к раствору (Bu₃NH)₂рТ в DMF в ^{31}P -ЯМР-спектре реакционной смеси наблюдается исчезновение сигнала исходного нуклеотида, но сигнал ацилфосфатов (III) отсутствует (табл. 1, эксперимент 14). Регистрируется серия мультиплетов, смещенных в сильное поле. На основании их положения, характерного для замещенных полифосфатов [14], а также исчезновения этих сигналов после добавления в реакционную смесь морфолина, мы отнесли полосы –23.97 м.д. (мультиплет, 41 %P) и –26.34 м.д. (мультиплет, 19 %P) к центральным атомам фосфора P^1, P^2, P^3 -тримидин-5'-три- и P^1, P^2, P^3, P^4 -тетратимидин-5'-тетраполи-

фосфатов ((VIIIa, б) и (IXa, б) соответственно). Сигналы концевых атомов фосфора этих соединений регистрируются при -11.93 м.д. (мультиплет, 30 %P), возможно, перекрываясь с сигналами пирофосфатов (Va, б). Мультиплет сложного строения при -19.27 м.д. (10 %P) может соответствовать концевым ацилированным атомам фосфора триполифосфатов (VIIIa, б), а аналогичные сигналы тетраполифосфатов (IXa, б), вероятно, попадают в район -22 м.д., перекрываясь с сигналами P^2 -атомов триполифосфатов (VIIIa, б).

Обработка этой реакционной смеси морфолином (табл. 1, эксперимент 17) дает морфолиды (VIIa, б) (29 %P), пирофосфаты (Va, б) (42 %P) и триполифосфаты (VIIIa, б) (15 %P). Кроме того, в спектре присутствуют несколько неидентифицированных полос. Обращает на себя внимание отсутствие среди продуктов реакции фосфорилирования нуклеотидов (Ia, б), чего не наблюдалось при использовании других ацилирующих реагентов.

Ацилфосфаты (IIIa, б) (2 синглета, -8.95 м.д. и -9.33 , 6 %P) удалось зарегистрировать при дробном добавлении ТВВ (3 + 3 экв.) к раствору рТ в DMF (табл. 1, эксперименты 15 и 15'). В остальной картина ^{31}P -ЯМР-спектра для этого варианта проведения реакции была аналогична описанной выше. После второго добавления ТВВ отмечалась явная перекачка интенсивности сигналов из области $-(11-12)$ м.д. (уменьшение с 37 до 12 %P) в область $-(24-26)$ м.д. (увеличение от 10 до 46 %P), по-видимому, вследствие увеличения длины полифосфатов или их ацилирования. Результат реакции с морфолином был сходен с приведенным выше (табл. 1, эксперимент 18).

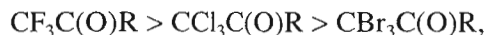
Существенно большее количество AP (IIIa, б) было получено в реакции ТВВ с суспензией рТ в CH_3CN в присутствии V_2N (табл. 1, эксперимент 16). Реакционная смесь содержала ацилфосфаты (IIIa, б) (39 %P), пирофосфаты (Va, б) (28 %P) и полифосфаты (VIIIa, б) и (IXa, б) (32 %P). Сдвиг всех сигналов на ~ 2 м.д. в сильное поле в данном случае происходит, вероятно, из-за увеличения кислотности среды вследствие использования меньшего количества амина и свободного нуклеотида. Низкая степень ионизованности фосфатной группы последнего (и следовательно, ее нуклеофильность) и гетерофазный режим проведения реакции способствовали существенному повышению выхода AP. Обработка реакционной смеси морфолином (табл. 1, эксперимент 19) дает морфолиды (VIIa, б) (42 %P), нуклеотиды (Ia, б) (4.6 %P), пирофосфаты (Va, б) (37 %P), триполифосфаты (VIIIa, б) (3 %P) и несколько неидентифицированных соединений. Фосфорилирующую активность AP (IIIa, б) в данном случае определяли не по выходу морфолидов (VIIa, б), так как последние образуются не только за счет реакции мор-

фолина с AP, но и в результате взаимодействия его с полифосфатами. Поэтому мы оценивали этот параметр "обратным" способом – по ацилирующей активности AP (IIIa, б), т.е. по накоплению нуклеотидов (Ia, б), образующихся после атаки морфолина по карбонильному атому углерода ацильного компонента AP. В этом случае ацилирующая активность равна $A_a = 4.6/39 \times 100 = 11\%$, а фосфорилирующая – $A_p = 100 - 11 = 89\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ацилирование рТ соединениями типа CHAl_3COX в присутствии третичного амина протекает, вероятно, двумя путями – как через образование ацилламмониевого комплекса, так и за счет прямой реакции. Вклад каждой из реакций оценить затруднительно ввиду высокой скорости P -ацилирования. 3'- O -ацилирование рТ протекает существенно медленнее, причем скорость реакции зависит от типа ацилирующего реагента. Так, по данным ^{31}P -ЯМР, время полупревращения в реакции O -ацилирования рТ в DMF при 25°C в случае TSA равно $\tau_{1/2} = \sim 4$ мин, TCC – менее 1 мин и ТВВ – ~ 1.5 мин. В аналогичной реакции рТ с TFA [1] AP со свободной 3'-ОН-группой зафиксировать вообще не удавалось. Поэтому соединения типа CHAl_3COX можно расположить в следующий ряд по уменьшению O -ацилирующей активности: $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O} > \text{CCl}_3\text{COCl} > \text{CBr}_3\text{COBr} > (\text{CCl}_3\text{CO})_2$.

Весьма вероятно, что и по P -ацилирующей активности эти соединения образуют такой же ряд. Скорость деблокирования 3'-ОН-групп в морфолиде (VIIб) при действии морфолина изменяется несколько иначе. 3'- O -трифторацетильная группа удаляется метанолом в течение нескольких секунд, а в присутствии морфолина ее зафиксировать вообще не удается [2]; для реакции морфолинолиза в случае O -трихлорацетильного производного (VIIб) $\tau_{1/2} = \sim 3$ мин, трибромацетильного – ~ 8 мин. Ряд активности в этом случае выглядит следующим образом:



где R = 3'- O -нуклеозидил-5'-фосфат. Так как указанные группы близки по своим электрофильным свойствам, такое различие можно объяснить возрастанием в этом ряду стерических затруднений для нуклеофильной атаки карбонильной группы.

Исследование взаимодействия ацилирующих агентов с рТ в присутствии третичного амина показало, что процесс ацилирования в данном случае представляет собой систему нескольких параллельных реакций, часть из которых обратимы. Ацилирующий реагент расходуется в нескольких конкурентных процессах: P - и O -ацилирование нуклеотида, реакции с третичным амином и, возможно, с диметиламиногруппой DMF [15]. Неко-

торые из этих реакций могут протекать с высокими скоростями. Поэтому ацилирующие реагенты, добавленные в небольшом избытке, за время записи ^{31}P -ЯМР-спектра (около 3 мин) практически полностью исчезают и изменения состава реакционной смеси во времени не наблюдается (табл. 1, эксперименты I и I'). Этот факт в сочетании с значительным превышением (по сравнению со стехиометрическим) количества ацилирующего реагента, требуемого для полного прохождения реакции, подтверждают рассмотренную трактовку механизма процесса ацилирования.

Взаимодействие ацилирующего агента с третичным амином протекает, вероятно, по нескольким путям. Например, может происходить восстановление карбонильной группы ацильного фрагмента в составе ацилтрибутиламмониевого комплекса, или гофмановское расщепление соли ацилтрибутиламмония с выделением бутилена [16–18]. Подтверждением этому служит появление окраски, характерной для образования комплекса с переносом заряда, и выделение газообразных продуктов.

Исследование фосфорилирующих свойств AP (IIa, б) в реакции с морфолином выявило их существенную зависимость от условий проведения реакции ацилирования рТ. Поэтому мы изучили влияние различных факторов на выход AP и морфолидов (VII). Ход реакции в этих экспериментах контролировали при помощи ионообменной МКХ. Варьирование типа третичного амина – замена трибутиламина на триэтиламин или трибензиламин – и его количества в диапазоне 3–5 экв. не оказывало значительного влияния на выход AP. Более значимыми факторами оказались количество ацилирующего агента и его соотношение с количеством третичного амина, содержание влаги в реагентах и растворителях, порядок смешивания реагентов, тип растворителя и даже способ приготовления раствора соли рТ в DMF. Было найдено, что при ацилировании рТ в DMF лучше всего применять большой избыток ацилирующего реагента (6–8 экв.) при меньшем количестве третичного амина (3–4 экв.). Это снижает влияние побочных реакций на ход Р-ацилирования, хотя и остается возможность ацилирования самого растворителя [15]. Попытки подобрать другой растворитель для реакции ацилирования были малоуспешны, так как хлороформ, диметилацетамид и сульфолан плохо растворяют трибутиламмониевую соль рТ, а диметилсульфоксид и пиридин реагируют с ацилирующими реагентами. Оптимальным растворителем оказался CH_3CN , в котором не наблюдается образование формилфосфатов (IVa, б) и уменьшается содержание пирофосфатов (Va, б) вследствие гетерофазного характера реакции и низкой растворимости рТ в

реакционной смеси. Но последнее обстоятельство имеет и негативную сторону – на начальной стадии реакции ацилирования трудно достигнуть высокой концентрации рТ по сравнению с другими нуклеофилами (Bu_3N , примесь воды), что приводит к невыгодному соотношению скоростей конкурентных процессов фосфо- и аминоацилирования.

Исследование зависимости фосфорилирующей активности AP (IIб) от присутствия нуклеофильного катализатора показало, что, как и в случае трифторацетильного AP [1], обработка AP (IIб) MeIm приводит к существенному увеличению выхода морфолидов (VII) в реакции фосфорилирования. Вероятно, здесь реализуется аналогичная схема превращений: MeIm вступает в равновесную реакцию с AP (IIб) и, атакуя его по двум реакционным центрам – карбонильному атому углерода ацильного компонента и атому фосфора фосфокомпонента, – превращает AP в термодинамически устойчивую систему – смесь цвиттер-ионного метилимидазолида (VIб) и трихлорацетат-аниона. Подобная реакция в случае формилфосфатов (IVa, б) не приводит к каким-либо заметным его превращениям, вероятно, вследствие существенно более высокой нуклеофильности формиат-аниона по сравнению с трихлорацетат-ионом и, следовательно, существенно меньшей термодинамической стабильности такой системы. Аналогичный результат наблюдался и в случае ацетилфосфата, полученного реакцией рТ с уксусным ангидридом. Он не проявлял фосфорилирующей активности ни в реакции с MeIm, ни с морфолином (данные не приведены). Неколичественный выход морфолида в расчете на метилимидазолид (VIб) в реакции аминирования, не отмечавшийся в случае TFA, может быть вызван присутствием в смеси формилфосфатов (IVa, б), дающих при обработке морфолином значительное количество рТ, а следовательно, и пирофосфатов (Va, б).

Различие состава реакционных смесей, полученных при взаимодействии рТ с TCA и TCC, представляет определенный интерес для оценки влияния замены уходящей группы в ацилирующем реагенте на ход реакции ацилирования. Так, в случае TCC практически отсутствовали продукты побочной реакции – формилфосфаты (IV). Вообще, появление этого соединения при ацилировании рТ несколько неожиданно ввиду высокой степени очистки применяемого нами DMF от примесей воды и формиата. Поэтому можно предположить, что образование трихлорацетилформиата, являющегося предшественником формилфосфатов (IV) и обладающего формилирующими свойствами по данным [9], происходит скорее за счет реакции TCA с DMF (например, аналогич-

но описанной в работе [15]), а не с ионами формиата, хотя такая возможность полностью не исключена. Результатом аналогичного процесса в случае ТСС может быть образование неустойчивого формилхлорида, быстро распадающегося с выделением HCl и CO [19], что и объясняет отсутствие формилфосфатов (IV) при взаимодействии рТ и ТСС в DMF.

Реакция рТ с ТВВ вызвала наибольшие трудности при интерпретации ее результатов. Отсутствие ацилфосфатов (IIIa, б) при взаимодействии ТВВ с рТ (табл. 1, эксперимент 14) или образование их в незначительных количествах (табл. 1, эксперименты 15 и 15') – весьма неожиданно. Судя по характеру ³¹P-ЯМР-спектра, процесс взаимодействия ТВВ и рТ протекает по более сложному механизму, чем реакция рТ с другими ацилирующими реагентами. Образующийся на первой стадии трибромацетилфосфат (III), является, вероятно, активным фосфорилирующим агентом вследствие стерического затрудненности нуклеофильной атаки по карбонильной группе ацильного компонента. Поэтому при его взаимодействии с исходным рТ должны образовываться в основном пирофосфаты (V), причем эта реакция (рТ + III) в данном случае (в отличие от TFA, TCA и TCC), вероятно, протекает с более высокой скоростью, чем ацилирование нуклеотида под действием ТВВ. Такое различие в скоростях может быть вызвано тем, что трибромацетильный фрагмент, обуславливающий низкую ацилирующую активность ТВВ и AP вследствие стерического фактора, в составе AP (III) оказывает сильное активирующее влияние на атом фосфора нуклеотида ввиду своей высокой электрофильности и обеспечивает высокую скорость реакции фосфорилирования. В результате пирофосфаты (Va, б) становятся основным продуктом реакции и, обладая достаточно сильными нуклеофильными свойствами [14], могут реагировать дальше (последовательно с ТВВ и рТ или с другой молекулой пирофосфата) по известной схеме активации фосфомоноэфиров арилсульфохлоридами [14] с образованием набора замещенных полифосфатов. Такому протеканию ацилирования в этом случае может способствовать также более низкая скорость побочной реакции ТВВ с Bu₃N по сравнению с TCA и TCC в силу стерического фактора. Это коррелирует с исчезновением исходного нуклеотида уже после добавления первых 3 экв. ТВВ (табл. 1, эксперимент 15), чего не отмечалось в случае других ацилирующих реагентов. Возможность ацилирования соединениями типа CNaI₃COX низконуклеофильных производных фосфорной кислоты, например, трифторацетилфосфатов, подтверждается данными работы [20]: при взаимодействии TFA и H₃PO₄ отмечено образование моно-, ди- и триацилфосфатов, сигналы

которых в ³¹P-ЯМР-спектре регистрируются соответственно при –6.13, –18.57 и –24.8 м.д. Возможно, в нашем случае протекает ацилирование не только пирофосфатов (Va, б), но и концевых фосфатных групп полифосфатов (VIIIa, б) и (IXa, б), о чем свидетельствует наличие интенсивных сигналов в области –26...–28 м.д. (табл. 1, эксперименты 14–16) и необычное соотношение (1 : 2) интегральных интенсивностей сигналов в областях спектра –11...–12 м.д. (концевые атомы фосфора) и –24–26 м.д. (центральные атомы фосфора), которое в случае три- и тетраполифосфатов должно составлять соответственно 2 : 1 и 1 : 1 [14].

Необычно протекает в описываемых экспериментах и реакция с морфолином (табл. 1, эксперименты 17 и 18). Нуклеотиды (Ia, б) в реакционной смеси или отсутствуют, или образуются в незначительном количестве (2%). При этом регистрируется большое количество пирофосфатов (Va, б) (29–42 %P). Очевидно, что образование морфолида в этих экспериментах происходит главным образом за счет взаимодействия морфолина с полифосфатами (VIIIa, б) и (IXa, б) с накоплением пирофосфатов (Va, б), что согласуется с данными работы [14].

В процессе ацилирования и последующего аминирования возможна еще одна побочная реакция – нуклеофильное замещение атомов брома в CBr₃-фрагменте на остатки Bu₃N или морфолина с образованием солей четвертичного аммония. Последние, образуя внутренние соли с фосфатами, могут вызывать сдвиг их сигналов в ³¹P-ЯМР-спектре в сильное поле, что усложняет картину спектра и приводит, например, к появлению неидентифицированных сигналов при 7.55, –1.85 и –2.72 м.д. (табл. 1, эксперименты 18, 19). Это подтверждается также появлением пиков незаряженных соединений при проведении ионообменной МКХ.

Таким образом, увеличение размера α-заместителей в ацильном компоненте ацилфосфатов затрудняет нуклеофильную атаку атома углерода карбоксильной группы и изменяет соотношение скоростей ацилирования и фосфорилирования в сторону увеличения последней. Фосфорилирующую активность A_p тригалогенацетилфосфатов тимидина по отношению к морфолину можно оценить как нулевую для трифторацетилфосфата [1], 77% – для трихлорацетилфосфата и 89% – для трибромацетилфосфата, что дает следующий ряд по возрастанию A_p: (CF₃CO)рТ < (CCl₃CO)рТ < (CBr₃CO)рТ.

Некоторое уменьшение кислотности ацильного компонента (pK_a (CF₃COOH) = 0.56, pK_a (CCl₃COOH) = 0.66 [21]) оказывает гораздо меньшее влияние на это соотношение.

Таким образом, обнаруженный нами эффект возрастания фосфорилирующей активности в ряду тригалогенацетилфосфатов открывает хорошие перспективы для практического применения ангидридов тригалогенуксусных кислот в качестве активирующих реагентов в реакциях фосфорилирования, в частности, при синтезе фосфопродуктов нуклеотидов. Так, например, ТСА, обладая более мягким чем другие реагенты ацилирующим действием, может найти применение в ТФА-прототируемом синтезе dNTP [2], где высокая ацилирующая активность ТФА приводит к ряду нежелательных эффектов, например, к значительному тепловому эффекту реакции и образованию окрашенных примесей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали рТ (Омутнинский химзавод), MeIm (Fluka, Швейцария), SOCl_2 (Merck, Германия), DEAE-сефадекс А-25, 40–125 мкм (Sigma, США). Остальные растворители и реактивы – отечественного производства.

Методы. ТСХ проводили на пластинках DC-Alu-folien Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Германия) в системе $\text{CHCl}_3\text{--CH}_3\text{OH--1 M NH}_4\text{OAc}$ (pH 7.5) (10 : 10 : 2 v/v). Обнаружение продуктов на хроматограммах проводили в УФ-свете (254 нм) и реактивом Дише (0.5% цистеин в 3 M H_2SO_4). МКХ выполняли на хроматографе “Милихром-4” (ПО Научприбор, г. Орел), используя колонку 2 × 62 мм с носителем Полисил СА-500 (15 мкм, любезно предоставлен С.И. Ястребовым, НПО “Вектор”) и ступенчатый (7 × 0.3 мл) градиент 0–1 M NH_4OAc (pH 7, скорость элюции 200 мкл/мин).

УФ- и ИК-спектры регистрировали на спектрофотометрах Specord M-40 и M-80 (Carl Zeiss, Германия) соответственно. Показатель преломления определяли на рефрактометре ИРФ-22.

^{31}P -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах AC-200 и AM-400 (Bruker, Германия) на частотах соответственно 81.015 и 161.977 МГц в DMF, CH_3CN и D_2O при 25°C с внешним стандартом 85% H_3PO_4 ; ^1H -ЯМР-спектры – на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия) на частоте 200.13 МГц в D_2O при 30°C с внешним стандартом $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$.

Растворители. CH_3CN перегоняли над P_2O_5 и затем над CaH_2 , DMF – над BaO и затем над H_3BO_3 в вакууме, хранили над молекулярными ситами 4 Å; морфолин – над KOH, Vc_3N – над KOH, затем выдерживали при 80°C 1 ч с 5 г ToSCl , гасили 1 мл воды и перегоняли над KOH; SOCl_2 перегоняли над $(\text{PhO})_3\text{P}$, PBr_3 перегоняли в вакууме.

Хлорангидрид трихлоруксусной кислоты (ТСС) синтезировали по аналогии с методикой [22] из 50 г (0.3 моль) трихлоруксусной кислоты, 25 мл (0.33 моль) SOCl_2 и 2 мл (0.03 моль) DMF. После нагревания (2 ч, 80°C) и перегонки с колонкой 20 см получали 42 г ТСС (78%). Т. кип. 114–116°C (лит. 114–116°C [21]). ИК (cm^{-1}): 1800 (C=O), 852 (C–Cl).

Трихлоруксусный ангидрид (ТСА) получали согласно [23, 24] из 20 г (0.118 моль) трихлоруксусной кислоты, 5 мл SOCl_2 (0.068 моль) 0.5 мл DMF (6 ммоль). После нагревания 5 ч при 120°C и перегонки в вакууме получали 11 г ТСА (60%). Т. кип. 96–98°C/12 мм Hg (лит. 222°C [23]). n_D^{25} 1.4875 (лит. 1.4840 [23]). ИК (cm^{-1}): 1848 (C=O), 1104 (C–O–C), 848 (C–Cl).

Бромангидрид трибромуксусной кислоты (ТБВ) получали согласно методике [25] из 25 г (0.085 моль) трибромуксусной кислоты и 3.4 мл (0.037 моль) PBr_3 . Нагревание при 120°C в течение 7 ч с последующей перегонкой в вакууме дает 10 г ТБВ (63%). Т. кип. 88–89°C/14 мм Hg. ИК (cm^{-1}): 1792 (C=O), 644 (C–Br).

Приготовление раствора $(\text{Vc}_3\text{NH})_2\text{pT}$ в DMF.
Вариант 1. рТ (кислота, 0.322 г, 1 ммоль) высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение ночи, растворяли при нагревании до 50°C в 2.66 мл абс. DMF и 0.48 мл (2 ммоль) Vc_3N (общий объем 3.3 мл) и полученный 0.3 M раствор использовали в последующих реакциях с ацилирующими реагентами.

Вариант 2. рТ (кислота, 0.322 г, 1 ммоль) суспендировали в абс. CH_3CN (15 мл), добавляли Vc_3N (0.48 мл, 2 ммоль) и упаривали досуха в вакууме. Упаривание с CH_3CN (15 мл) повторяли еще 2 раза, остаток высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение ночи, растворяли при температуре 22–25°C в 2.66 мл абс. DMF (общий объем 3.3 мл), получая 0.3 M раствор $(\text{Vc}_3\text{NH})_2\text{pT}$.

Реакция $(\text{Vc}_3\text{NH})_2\text{pT}$ с ТСА, ТСС и ТБВ в DMF. К 0.3 M раствору $(\text{Vc}_3\text{NH})_2\text{pT}$ (0.33 мл, 0.1 ммоль) добавляли 2–5 экв. третичного амина (48–120 мкл Vc_3N , или 28–70 мкл Et_3N , или 57.5–144 мг VzI_3N), 0.1–0.12 мл абс. DMF (для получения ~0.15 M концентрации рТ в реакционной смеси) и полученный раствор обрабатывали 3–6 экв. ацилирующего реагента (ТСА – 55–110, ТСС – 34–68, ТБВ – 38–76 мкл). Наблюдался легкий разогрев, появлялась окраска от желтого до бурого цвета, иногда выделялся газ. Смесь переносили в ампулу и в течение 2–3 мин записывали ^{31}P -ЯМР-спектр. Затем к смеси добавляли 15–20 экв. морфолина (120–160 мкл). Смесь разогревалась, становилась светло-желтой, при охлаждении выпадали кристаллы. Снова записывали ^{31}P -ЯМР-спектр, отбирали аликвоту 0.1 мл, выливали ее в

1 мл смеси вода–хлороформ (1 : 1) и водный слой исследовали при помощи МКХ и ТСХ.

Реакция рТ с ТСА и ТВВ в CH_3CN . рТ (32 мг, 0.1 ммоль) высушивали упариванием с CH_3CN (3 × 2 мл), добавив 0.48 мл Bu_3N (в случае реакции с ТВВ амин не добавляли), и затем в вакууме в течение ночи над P_2O_5 при 22–25°C. Остаток суспендировали в CH_3CN (0.45 мл) в присутствии Bu_3N (96 мкл, 0.4 ммоль) или VzI_3N (116 мг, 0.4 ммоль), добавляли ацилирующий реагент (90 мкл, 0.5 ммоль ТСА или 76 мкл, 0.6 ммоль ТВВ) и записывали ^{31}P -ЯМР-спектр. Смесь обрабатывали морфолином (120 мкл, 1.5 ммоль в случае ТСА или 150 мкл, 1.8 ммоль в случае ТВВ). Снова записывали ^{31}P -ЯМР-спектр.

Выделение продуктов реакции ацилирования рТ. Реакционную смесь, полученную как описано выше для случая реакции в DMF, но с увеличенными в 3 раза загрузками, разбавляли водой до 5 мл, обрабатывали конц. NH_4OH (0.5 мл.), выдерживали 2 ч, экстрагировали эфиром (5 мл) и водный слой упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде (50 мл) и нанесли на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (HCO_3^- -форма, 2.1×15 см). Элюцию проводили, используя линейный градиент 0–0.2 М NH_4HCO_3 . После выполнения обычных в таких случаях процедур продукты реакции ацилирования выделяли в виде натриевых солей осаждением 6% NaClO_4 в ацетоне и далее использовали для доказательства их структуры.

Морфолид рТ (VIIa). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м.д., D_2O): 4.96 (с, 1P); ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д., D_2O): 7.69 (с, 1H, H6), 6.30 (т, 1H, H1'), $J_{1',2a} = J_{1',2b} = 6.8$ Гц), 4.51 (м, 1H, H3'), 3.94 (м, 1H, H4'), 3.76 (м, 2H, H5'), 2.32 (м, 2H, H2'), 1.86 (с, 3H, CH_3), 3.14 (каж. т, 4H, $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.01 (каж. т, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2$, $J_{\text{OCH}_2\text{NCH}_2} = 6.4$ Гц); электронный спектр (вода): λ_{max} 267 нм, λ_{min} 232 нм; R_f 0.64 в системе А и время выхода на МКХ (2.1 мин) совпадают с характеристиками образца морфолида (VIIa), полученного по [1].

P^1, P^2 -Дитимидин-5'-пирофосфат (Va). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м.д., D_2O): -11.51 (с, 2P); электронный спектр (вода): λ_{max} 267 нм, λ_{min} 232 нм, спектральные отношения: (250/260) 0.648, (280/260) 0.774, (290/260) 0.278; R_f (система А) 0.32, время выхода на МКХ 6.74 мин. Оба последних показателя совпадают с характеристиками контрольного образца пирофосфата (Va), полученного по [26].

Тимидин-5'-фосфат (IIa). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м.д., D_2O): 0.63 (с, 1P); электронный спектр (вода): λ_{max} 267 нм, λ_{min} 232 нм, спектральные отношения: (250/260) 0.649, (280/260) 0.778, (290/260) 0.280; R_f (система А) 0.11 и время выхода на МКХ 8.22 мин совпадают с характеристиками контрольного образца рТ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Г.В. Шишкину и В.Н. Сильникову за обсуждение результатов и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачев В.С. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 212–217.
2. Богачев В.С. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 699–705.
3. Chantranne H. // Nature. 1949. V. 164. P. 576.
4. Moldave K., Castelfranco P., Meister A. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. P. 363–378.
5. Шабарова З.А., Богданов А.А. // Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 180.
6. Todd A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1959. V. 45. P. 1389.
7. Todd A.R. // Chem. Soc. Spec. Publ. 1957. P. 91.
8. Lambie A.J. // Tetrahedron Lett. 1966. P. 3709–3713.
9. Emery A.R., Gold V. // J. Chem. Soc. 1950. P. 1455.
10. Shumyantseva V.V., Sokolova N.I., Shabarova Z.A. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. P. 903–916.
11. Соколова Н.И., Носова В.В., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // Докл. АН СССР. 1972. Т. 206. С. 129–131.
12. Носова В.В., Соколова Н.И., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. С. 1130–1133.
13. Лебедев А.В., Резвухин А.И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 149–185.
14. Зарытова В.Ф. // Механизм реакций фосфорилирования, используемых в биоорганической химии. Биоорганическая химия. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1984. С. 58–78.
15. Vecan J., Kulcsar L., Kovacs M. // Synthesis. 1980. P. 883–884.
16. Кайтмазова Г.С., Гамбарян Н.П., Рохлин Е.М. // Успехи химии. 1989. Т. LVIII. С. 2012–2035.
17. Fraser R.R., Swingle R.B. // Tetrahedron. 1969. V. 25. P. 3469.
18. Платошкин А.М., Чебурков Ю.А., Кнунянц И.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1969. № 1. С. 112.
19. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. М.: Химия, 1968. С. 176.
20. Smith T.P., Corby B.W. // J. Org. Chem. 1998. V. 63. P. 8946–8951.
21. Химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1988. Т. 5. С. 9–296.
22. Bosshard H.H., Mory R., Schmid M., Zollinger H. // Helv. Chim. 1959. V. 42. P. 1653.
23. Beilst. 1942. Bd. 2. S. 210.
24. Fichter, Fritch, Muller // Helv. Chim. Acta. 1923. Bd. 6. S. 503.
25. Steinkopf, Mieg, Herold // Chem. Ber. 1920. Bd. 53. S. 1147.
26. Weimann G., Khorana H.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. V. 84. P. 4329–4338.

The Interaction of Trihalogenoacetic Anhydrides and Trihalogenoacetyl Chlorides with Thymidine 5'-Phosphate as an Approach to New Activating Agents in the Phosphorylation Reactions for Nucleotides

V. S. Bogachev*# and P. A. Ulanov

Phone: +7 (3832) 334-710, fax: +7 (3832) 334-301, e-mail: bogachev@inboch.ru
Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The interaction of thymidine 5'-phosphate with trichloroacetic anhydride, trichloroacetyl chloride, and tribromoacetyl bromide was studied in dimethylformamide and acetonitrile in the presence of tertiary amines. The first two reactions gave the mixed anhydride of trichloroacetic and thymidylic acids (acyl phosphate) as the major product and P^1, P^2 -dithymidine 5'-pyrophosphate as the byproduct. The third reaction proceeded by a more complicated mechanism and mainly led to substituted polyphosphates. The subsequent treatment of the reaction mixtures with morpholine resulted in thymidine 5'-phosphoromorpholidate in a high yield. The phosphorylating activities of the trichloroacetyl and tribromoacetyl phosphates were 77 and 89%, respectively. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: acid halides, acyl phosphates, phosphorylation, thymidine, trihalogenoacetic anhydride, trihalogenoacetyl halide