



УДК 547.963.32 : 543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ ФОСФОДИЭФИРНОЙ
СВЯЗИ ПРИ СИНТЕЗЕ АНАЛОГОВ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ — ПРОИЗВОДНЫХ
1-(1', 3'-ДИОКСИПРОПИЛ-2')УРАЦИЛА

Гиллер С. А., *Заринь Д. Э.*, *Жук Р. А.*,
Кнорре Д. Г., *Зарытова В. Ф.*, *Лебедев А. В.*

*Институт органического синтеза
Академии наук ЛатвССР, Рига;*

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

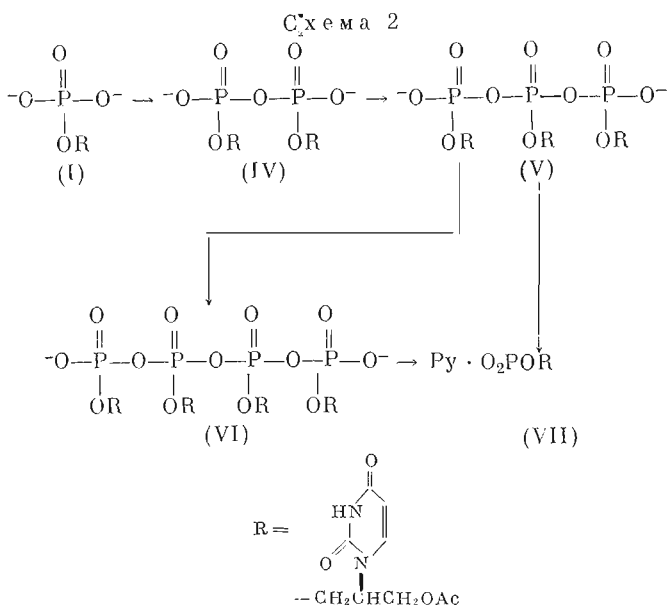
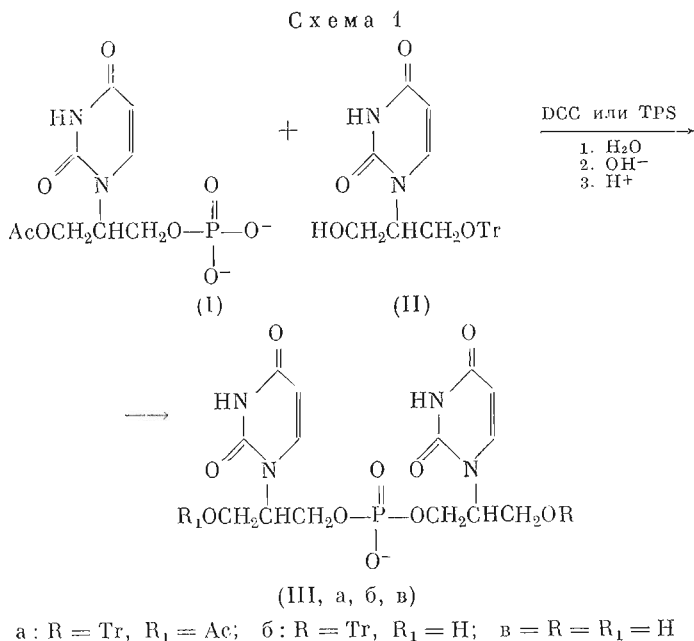
Взаимодействием 1-(3'-О-ацетил-1',3'-диоксипропил-2')урацил-1'-фосфата с 1-(1'-О-тритил-1',3'-диоксипропил-2') урацилом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида или 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида с последующим снятием защитных групп получен с хорошим выходом фосфодиэфир — аналог UpU, в котором остатки уридина заменены 1-(1',3'-диоксипропил-2')урацилом. Механизм реакции, по данным спектроскопии ³¹P-ЯМР, существенно не отличается от механизма синтеза динуклеозидмонофосфатов. В присутствии TPS как конденсирующего агента и избытка аналога нуклеозида получен диоксиспиральный аналог тринуклеозидмонофосфата.

Олигомеры на основе фосфорных эфиров диоксиспиральных производных пиримидиновых и пуриновых оснований привлекают внимание как аналоги олигонуклеотидов [1].

Показано избирательное ингибирование диоксиспиральным аналогом олиготимидилата инициации биосинтеза РНК in vitro на различных ДНК-матрицах [2]. Однако механизм образования фосфодиэфирной связи при синтезе диоксиспиральных аналогов олигонуклеотидов до сих пор не изучен. По данным работы [1], образование фосфодиэфирной связи между защищенными производными 9-(2',3'-диоксипропил-1')аденина и его фосфорного эфира проходит успешно при применении в качестве конденсирующего агента N,N'-дициклогексилкарбодимида. В качестве конденсирующих агентов для синтеза аналогов динуклеозидмонофосфатов [3] и тринуклеозидмонофосфатов [4] использовались также ароматические сульфохлориды.

В настоящей работе мы исследовали механизм образования фосфодиэфирной связи между 1-(3'-О-ацетил-1',3'-диоксипропил-2')урацил-1'-фосфатом (I) [5] и 1-(1'-О-тритил-1', 3'-диоксипропил-2')урацилом (II) [6] (схема 1) под действием 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида или дициклогексилкарбодимида методом импульсной спектроскопии ³¹P-ЯМР.

Сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.



Для интерпретации полученных спектров ³¹P-ЯМР использованы результаты работ [7—13] по исследованию взаимодействия дезоксирибонуклеотидов с TPS и DCC.

При взаимодействии монофосфата (I) с 3,5 экв. DCC в растворе абсолютного пиридина в спектрах ³¹P-ЯМР наблюдается быстрое исчезновение сигнала исходного соединения (δ —1,1 м.д.) и появление синглета с δ 10,5 м.д., который соответствует дивалентному пирофосфату (IV) (схема 2), а также постепенное накопление в реакционной смеси линейного трифосфата (V), спектр которого состоит из дублета и триплета с центрами при 11,6 и 22,2 м.д. соответственно и соотношением интенсивностей 2 : 1 (*J*_{РОР} 18,0 ± 0,4 Гц) (рис. 1а). Дополнительные сигналы при 23—24 и 11—12 м.д. отнесены к тетразамещенному тетрафосфату (VI).

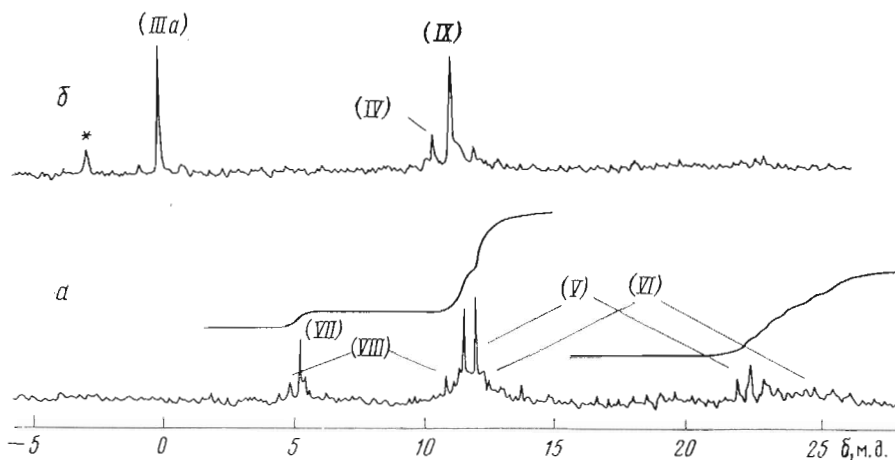


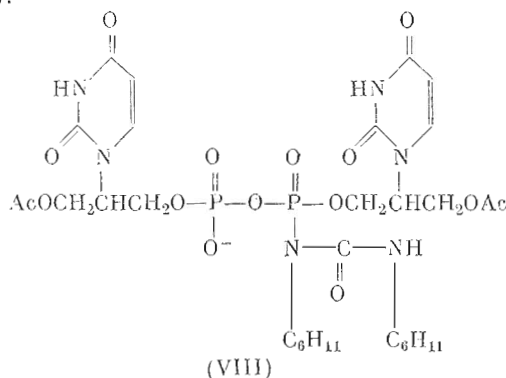
Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной: *a* — добавлением к (I) 3,5 экв. DCC (через 22 ч), *b* — последующим добавлением 1,4 экв. (II) (через 30 мин). * — сигнал не отнесен

В ходе реакции количество пирофосфата (IV) убывает, а концентрация трифосфата (V) и тетрафосфата (VI) постепенно возрастает, и уже через 30 мин соединения (V) и (VI) становятся основными компонентами реакционной смеси, составляя каждый по 35—40% от общего количества продуктов реакции.

Через 1 ч после начала реакции в спектрах ^{31}P -ЯМР наряду с сигналами соединений (V) и (VI) регистрируется синглет с δ 5,2 м. д. (рис. 1*a*). На основании сравнения со спектрами продуктов взаимодействия мононуклеотидов с DCC [10] этот сигнал можно отнести к активному фосфорилирующему производному, для которого наиболее вероятно структура пиридинового производного $\text{Py} \cdot \text{O}_2\text{POR}$ (VII).

Соединения (V), (VI) и (VII) являются основными конечными продуктами взаимодействия (I) с DCC, причем содержание (VII) не превышает 7% даже через 22 ч после начала реакции.

Малоинтенсивные сигналы при ~ 5 и ~ 10 м.д., согласно работе [10], отнесены к $\text{N}-(\text{P}^1, \text{P}^2\text{-дизамещенной пирофосфорил})\text{-N}, \text{N}'\text{-дидицилогексилмочевине}$ (VIII):



Взаимодействие монофосфата (I) с TPS происходит через те же стадии, что и в случае DCC, с последовательным образованием соединений (IV) — (VII), однако реакция идет намного быстрее. Соединение (VII) обнаруживается через 8 мин после начала реакции и является основным конечным продуктом реакции.

Сравнение результатов настоящей работы с данными предыдущих исследований [7—10] указывает на отсутствие существенных различий в ме-

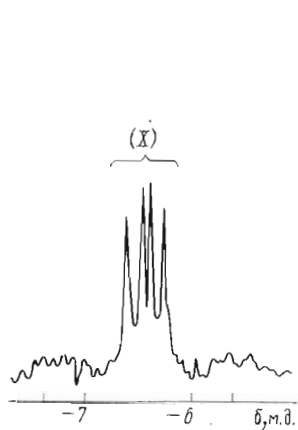


Рис. 2

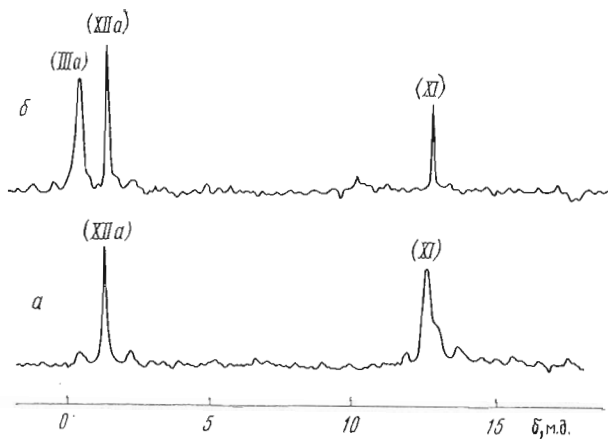


Рис. 3

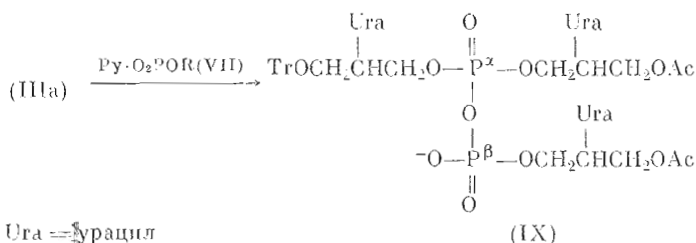
Рис. 2. Спектр ^{31}P -ЯМР соединения (X)

Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной из соединений (I) и (II) под действием TPS. *a* — к (I) добавлено 4 экв. TPS и выдержано 4 ч, затем 1,35 экв. (II) и спектр снят через 1,5 ч; *б* — та же реакционная смесь через 19 ч (заметно образование (IIIa) в результате частичного гидролиза (XI) влагой воздуха)

ханизме реакции фосфатной группы нуклеотидов и их диоксиалкильных аналогов с DCC или TPS.

При взаимодействии (I) с DCC и «нуклеозидным» компонентом (II) также наблюдаются сигналы промежуточных продуктов (IV) — (VI), однако содержание их быстро убывает и начинается накопление сигналов с центрами при $-0,1$ и $11,1$ м.д. (рис. 1б). Сигнал с $\delta -0,1$ м.д. отнесен к диэфирному атому фосфора в соединении (IIIa) (схема 1) на основании сравнения с заведомым образцом, выделенным с помощью препаративной хроматографии. Сигнал с $\delta 11,1$ м.д. отнесен к тризамещенному пирофосфату (IX), поскольку аналогичный сигнал регистрируется в первые же минуты при взаимодействии диэфира (IIIa) с соединением (VII) (схема 3).

Схема 3



Незначительное расщепление сигнала с $\delta 11,1$ м.д. обусловлено, по-видимому, сравнительно небольшим различием химических сдвигов ядер P^α и P^β в соединении (IX) по сравнению с соответствующим нуклеотидным производным [11, 13].

Через 3 ч после начала реакции в спектре реакционной смеси регистрируется появление нового мультиплета в интервале $-6,2 \div -6,5$ м. д. (рис. 2), интенсивность которого достигает 73% суммарной интенсивности сигналов к 44 ч. Анализ реакционной смеси с помощью электрофореза на бумаге показывает наличие соединения с $E_f = 0$, которое при обработке водой в течение 3 сут количественно превращается в диэфир (IIIa) (идентифицирован сравнением с заведомым образцом). На основании полученных данных сигнал с центром -6 м. д. отнесен к N-фосфорилдидицилогексил-

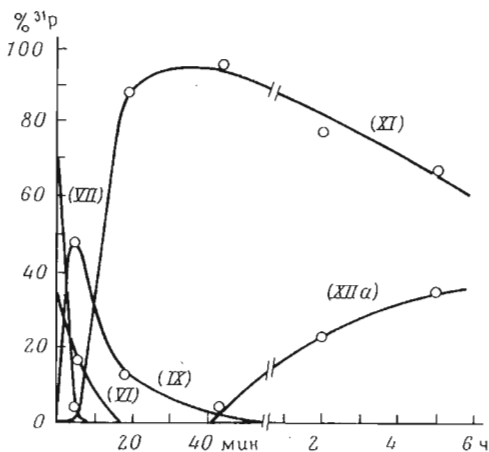
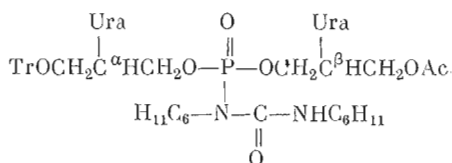


Рис. 4. Кинетические кривые образования продуктов взаимодействия (I) (после обработки TPS в течение 3 ч) с 1,35 экв. (II)

мочевине (X). Образование соединений такого типа наблюдалось также при взаимодействии динуклеозидмонофосфатов с DCC [10].



Ura = урацил (X)

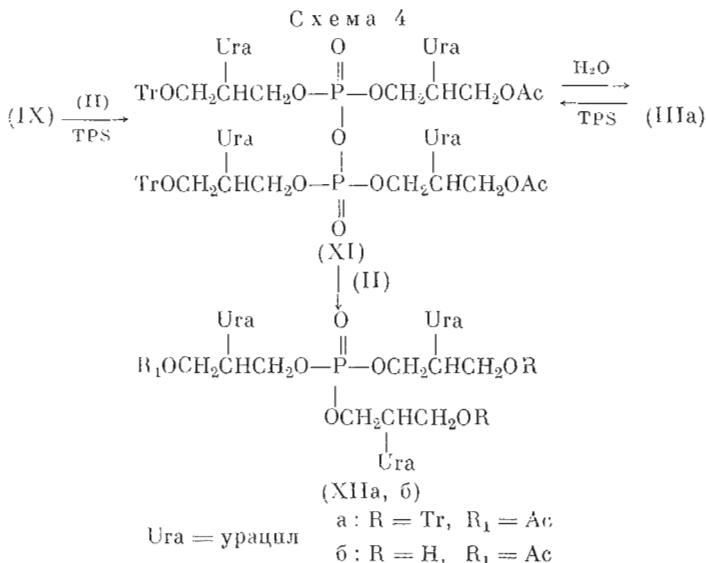
Мультиплетность сигнала соединения (X) обусловлена возможностью существования данного соединения в виде смеси изомеров в связи с наличием трех асимметрических атомов (C^α, C^β и P).

Конденсация соединений (I) и (II) под действием TPS несколько отличается от рассмотренной выше

реакции в присутствии DCC. При взаимодействии соединения (VII), полученного из продукта (I) и 4 экв. TPS, с 1,35 экв. соединения (II) регистрируется тризамещенный пирофосфат (IX) (сигнал с центром при δ 11,2 м. д.*), быстро превращающийся далее в тетразамещенный пирофосфат (XI) с δ 12,9 м. д. (рис. 3а и 4).

Структура пирофосфата (XI) однозначно доказывается его образованием при действии избытка TPS на диэфир (IIIa).

При действии на пирофосфат (XI) воды наблюдается обратная реакция с образованием диэфира (IIIa) (схема 4).



Тетразамещенный пирофосфат (XI) способен реагировать с аналогом нуклеозида (II) с образованием триэфира (XIIa) (δ 1,3 м. д.), сигнал которого по сравнению с диэфиром (IIIa) несколько смещен в сильное поле (рис. 3а, б).

Необходимым условием синтеза триэфира (XIIa) является практически полное превращение тризамещенного пирофосфата (IX) в тетраза-

* Химические сдвиги в присутствии сульфокислот несколько смещаются в сильное поле.

щенный пирофосфат (XI) (рис. 4). Прекращение реакции до начала образования триэфира (30 мин) приводит к количественному выходу диэфира (IIIa). Механизм образования триэфира (IIIa) через пирофосфат (XI) доказан прямым синтезом из диэфира (IIIa) (схема 4).

Таким образом, взаимодействие аналога нуклеотида (I) с «нуклеозидным» компонентом (II) с образованием фосфодиэфира (IIIa) может быть осуществлено с хорошим выходом при помощи как ДСС, так и TPS. Механизм реакции существенно не отличается от механизма синтеза динуклеозидмонофосфатов.

Применяя TPS в качестве конденсирующего агента и избыток аналога нуклеозида, можно получить диоксипальчиковый аналог тринуклеозидмонофосфата (XIIa).

Экспериментальная часть

Спектры ^{31}P -ЯМР записаны на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (Bruker — Physik AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта. Спектры записаны с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи ^{31}P — $\{^1\text{H}\}$.

Восходящую хроматографию осуществляли на бумаге FN-1 в системах: А — изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2; Б — изомасляная кислота — конц. аммиак — вода, 66 : 1,5 : 33; В — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5.

Электрофорез проводили на бумаге FN-12 в фосфатном буфере (рН 7) при 800 В или в глициновом буфере (рН 3) при 600 В в течение 2 ч.

Электрофоретическую подвижность (E_f) определяли относительно подвижности 1-(1',3'-диоксипропил-2')урацил-1'-фосфата.

Фосфат (I) превращали в PuH^+ -форму пропусканием через дауэкс 50×4 (PuH^+) и высушивали повторным упариванием с сухим пиридином. Кинетические эксперименты осуществляли непосредственно в ампуле спектрометра. Диаметр ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,3 мл. Концентрация ^{31}P в экспериментах с ДСС 0,14 М, а с TPS — 0,11—0,14 М. Детали проведения эксперимента даны в работах [8—10].

3'-О-Тритил-1-(1',3'-диоксипропил-2')урацил-1'-фосфорил-1'-1-(1',3'-диоксипропил-2')урацил (IIIб). Смесь пиридиниевой соли фосфата (I) (1800 ОЕ, 0,18 ммоль), защищенного диола (II) (0,11 г, 0,25 ммоль) и ДСС (0,13 г, 0,65 ммоль) в 1,3 мл сухого пиридина выдерживали 44 ч при 20°, исключая доступ влаги воздуха. Добавляли 0,3 мл воды и выдерживали 70 ч. Отфильтровывали выпавший осадок, фильтрат упаривали досуха в вакууме при 30° и обрабатывали 3 ч аммиаком (6 мл) в пиridине (6 мл) при 20°. Остаток после упаривания растворяли в 10 мл 50% этанола и разделяли на QAE-сефадексе А-25 в ступенчатом градиенте буфера $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, содержащего 50% этанола. Соединение (IIIб) элюируется 0,1 н. буфером. Выход 87%. E_f 0,71 (рН 7), 0,93 (рН 3). R_f 0,73 (А), 0,77 (Б).

1-(1',3'-Диоксипропил-2')урацил-1'-фосфорил-1'-1-(1',3'-диоксипропил-2')урацил (IIIв) и 1'-О-ацетил-1-(1',3'-диоксипропил-2')ди [(1',3'-диоксипропил-2')урацил-1']фосфат (XIIIб). а) Соединение (IIIб) обрабатывали 20 мин 80% уксусной кислотой при 100°. Осадок отфильтровывали, фильтрат несколько раз упаривали с водой для удаления уксусной кислоты. Получали соединение (IIIв). E_f 0,79 (рН 7), 0,94 (рН 3). R_f 0,46 (А), 0,30 (Б). УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{OH}^-}$ 267 нм, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{OH}^+}$ 266 нм.

б) Фосфат (I) (PuH^+) (1400 ОЕ, 0,14 ммоль) и 0,17 г (0,55 ммоль) TPS в 1,3 мл сухого пиридина выдерживали 3 ч, добавляли 0,08 г (0,19 ммоль) соединения (II) и оставляли на 20 ч при 20°. Приливали 0,5 мл воды. Через 24 ч реакционную смесь упаривали досуха и обрабатывали уксусной кислотой, как описано в методе а. После удаления уксусной кислоты реакционную смесь разделяли на QAE-сефадексе А-25,

элюируя сначала водой, а затем буфером $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, содержащим 10 % этанола, в ступенчатом градиенте. Фракцию, элюируемую 0,1 н. буфером, упаривали и обрабатывали водным аммиаком при 20° для полного снятия ацетильной защиты. После упаривания получали соединение (IIIb).

Триэфир (XIIb) выделяли из нейтральной фракции, элюируемой водой, разделением ее гель-фильтрацией на сефадексе G-10. E_f 0, R_f 0,55 (B), 0,28 (B).

ЛИТЕРАТУРА

1. Holý A. (1975) Collect. Czech. Chem. Commun., 40, 187—214.
2. Гиллер С. А., Грен Э. Я., Шомштейн З. А., Жук Р. А., Берзинь В. М., Пумпен П. П., Розенталь Г. Ф. (1975) Докл. АН СССР, 221, 473—476.
3. Михайлов С. Н., Крицын А. М., Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2588—2591.
4. Mikhailov S. N., Smrt J. (1975) Collect. Czech. Chem. Commun., 40, 2191—2194.
5. Hiller S. A., Zhuk R. A., Sheryna L. A., Zarin D. E. (1975) Nucleic Acids Res., Special Publ. No 1, pp. 169—171.
6. Hiller S. A., Zarin D. E., Zhuk R. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 721—727.
7. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1973) Докл. АН СССР, 212, 630—633.
8. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 85—96.
9. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Rezvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) Tetrahedron, 30, 3073—3079.
10. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. (1976) Биоорган. химия, 2, 189—198.
11. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 121—126.
12. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 126—131.
13. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 4, вып. 2, 139—149.

Поступила в редакцию
22.X.1976

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF PHOSPHODIESTER BOND FORMATION IN THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS—1-(1', 3'-DIHYDROXYPROPYL-2')URACIL DERIVATIVES

HILLER S. A., ZARIN D. E., ZHUK R. A., KNORRE D. G.,
ZARYTOVA V. F., LEBEDEV A. V.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences
of the Latv.SSR, Riga; Institute of Organic Chemistry,
Siberian Division of the Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

A high yield of phosphodiester, which is the analog of UpU where uridine residues are substituted for 1-(1',3'-dihydroxypropyl-2')uracil, has been obtained by interaction of 1-(3'-acetyl-1',3'-dihydroxypropyl-2')uracil 1'-phosphate with 1-(1'-O-trityl-1',3'-dihydroxypropyl-2')uracil in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride (TPS) with a subsequent removal of protective groups. The mechanism of this reaction according to NMR-³¹P spectroscopy does not considerably differ from that for the synthesis of dinucleoside monophosphates. Dihydroxyalkyl analog of trinucleoside monophosphate was formed as by-product when TPS was used as a condensing reagent in the presence of excess of nucleoside analog.