



УДК 547.963.32

КОНФОРМАЦИОННЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

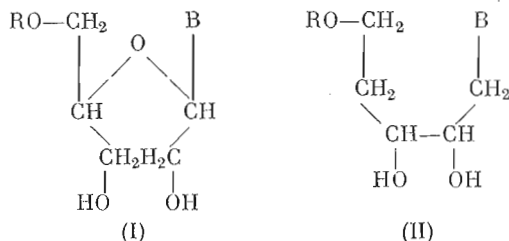
IV. СИНТЕЗ 2',3'-ЦИКЛОФОСФАТА 1'(R)-β-ОКСИЭТОКСИ-1'-(УРАЦИЛИЛ-1)-2'(R), 3'-ДИОКСИПРОПАНА*

Михайлов С. Н.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы конформационно-подвижные аналоги нуклеотидов на основе 1-(α-L-арабинопирапозил)урацила, который получали гликозилированием бис-триметилсилилурацила 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-α-L-арабинопиранозой в присутствии четыреххлористого олова с последующим удалением защитных групп. Для получения 1-(α-L-арабинопиранозил)урацил-2'-фосфата была использована изопропилиденовая защитная группа. После ее удаления, окисления периодатом натрия, последующих восстановления боргидридом натрия и циклизации в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида синтезирован аналог уридин-2',3'-циклофосфата.

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы конформационно-подвижные аналоги нуклеотидов и олигонуклеотидов, сохраняющие все функциональные группы природных соединений, но имеющие вместо рибофуранозного цикла полиоксиметиленовую цепочку [1—3] (соединения типа (I) и (II)):

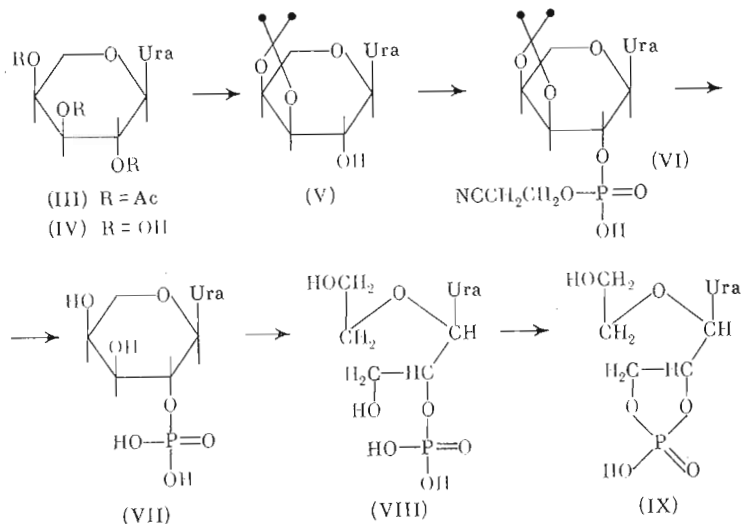


Было показано, что подобные соединения являются удобными инструментами для изучения механизма действия различных ферментов [4—8], а также для физико-химического изучения процесса внутримолекулярной ассоциации [9].

Настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена синтезу 2',3'-циклофосфата 1'(R)-β-оксиэтоксиди-1'-(урацилил-1)-2'(R),3'-диооксипропана (IX), конфигурация атомов C1 и C2 которого идентична конфигурации природных нуклеотидов. Синтез осуществлен по схеме на с. 640.

Исходным соединением выбран тетраацетат L-арабинопиранозы, который конденсировали с бис-триметилсилилурацилом в присутствии SnCl₄ по недавно разработанному методу [10]. В этом случае наблюдается только *транс*-гликозилирование по отношению к 2'-ацилоксигруппе. Снятие ацильных групп метанольным аммиаком приводило к пиранозиду (IV), структура которого доказана ПМР- (см. таблицу) и УФ-спектрами,

* Предыдущие сообщения см. [1—3].



а также периодатным окислением. Величина константы взаимодействия $J_{1',2'}$ 9,0 Гц подтверждает *транс*-расположение гетероциклического основания и 2'-ОН-группы, а pH-зависимость УФ-спектров — место гликозирования. На рис. 1 представлены спектры ПМР соединения (IV) и продуктов его периодатного окисления. При добавлении к раствору 0,1 ммоль соединения (IV) в D_2O 0,1 ммоль периодата натрия образуется эквимольная смесь диальдегидного производного, исходного соединения (IV) и муравьиной кислоты (рис. 1б). При добавлении 0,2 ммоль периодата натрия расщепление идет количественно до диальдегида и муравьиной кислоты (рис. 1в). На наш взгляд, примененный вариант периодатного окисления непосредственно в ампулах, используемых для регистрации спектров ПМР, удобен для определения структуры синтезированных соединений.

Синтез 1-(3',4'-О-изопропилиден- α -L-арабинопиранозил)урацила (V) осуществлен обработкой пиранозида (IV) сухим ацетоном в присутствии трифторуксусной кислоты [11].

Фосфорилирование изопропилиденового производного (V) β -цианэтилфосфатом с помощью триизопропилбензолсульфохлаорида давало фосфодиэфир (VI) с выходом 54%. После удаления β -цианэтильной и изопропилиденовой групп полученный с высоким выходом фосфат (VII) окисляли периодатом натрия, диальдегид без выделения восстанавливали боргид-

Спектры ПМР аналогов нуклеозидов и нуклеотидов в D_2O при 30° *

Соединение	Химические сдвиги, δ , м.д. (J, Гц)				
	6-Н	5-Н	1'-Н	2',3',4',5'a,5'b-Н	Другие сигналы
(IV)	7,83 (8,0)	5,97 (8,0)	5,52 (9,0)	4,14—3,77	—
(V)	7,72 (8,0)	5,96 (8,0)	5,50 (9,0)	4,60—3,90	Изопропилиден: 1,63; 1,47
(VI)	7,74 (8,0)	5,98 (8,0)	5,62 (9,0)	4,80—4,00	Изопропилиден: 1,67; 1,48 Цианэтил: 4,04 т (6,0; 6,0); 2,83 (6,0)
(VII)	7,84 (8,0)	5,98 (8,0)	5,66 (9,0)	4,60—3,90	—
(VIII)	7,77 (8,0)	5,88 (8,0)	5,97 (6,0)	4,50—3,70	—
(IX)	7,78 (8,0)	5,97 (8,0)	5,84 (6,0)	4,80—3,80	—

* Нумерация атомов, принятая для нуклеозидов.

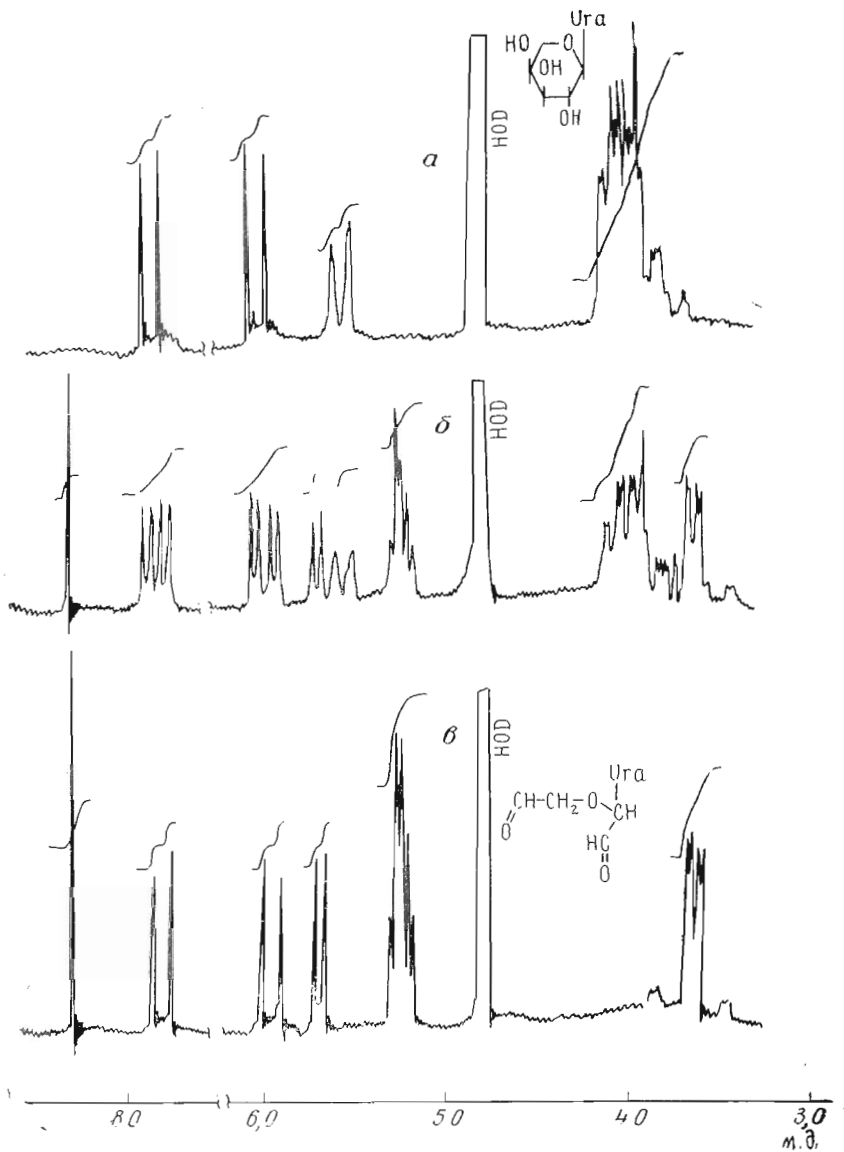


Рис. 1. Изменения в спектрах ПМР при периодатном окислении соединения (IV). *a* — спектр ПМР соединения (IV) (0,1 ммоль) в D₂O (0,5 мл) при 30°; *б* — после добавления 0,1 ммоль, *в* — 0,2 ммоль NaIO₄

ридом натрия, что приводило к соединению (VIII). Циклизация последнего N,N'-дихлоргексилкарбодимидом давала циклофосфат (IX) [12]. Структура полученных соединений была доказана УФ- и ПМР-спектрами, элементным анализом, данными электрофореза и хроматографии.

Следует отметить, что при окислении фосфата (VII) периодатом натрия не образуется муравьиная кислота, а в спектре ПМР продукта окисления альдегидные протоны при C3'- и C4'-атомах образуют дублет и триплет соответственно. Это доказывает, что фосфатная группа находится в 2'-положении, а окисление осуществляется по 3'-4'-связи.

На рис. 2 приведены спектры КД соединений (IV), (VII)—(IX) и уридина в воде. Спектры КД соединений (VIII) и (IX) похожи по форме на спектр уридина, но различаются между собой по амплитуде. Уменьшение

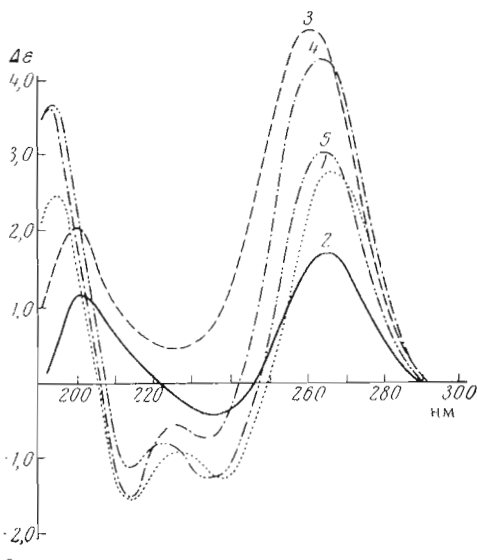


Рис. 2. Спектры КД в воде при 20°: 1 — уридин; 2 — пиранозид (IV); 3 — фосфат (VII); 4 — соединение (VIII); 5 — циклофосфат (IX)

Экспериментальная часть

Спектры ПМР сняты на спектрометрах BS 487C (ЧССР) и XL-100 (США). Спектры КД записывали на дихрографе Jobin-Yvon Dichrograph III (Франция), используя 1-см кюветы при чувствительности $5 \cdot 10^{-6}$. УФ-спектры сняты на приборе Specord UV-VIS (ГДР). Хроматографию проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) в системах: А — CHCl_3 — EtOH , 95 : 5; В — CHCl_3 — EtOH , 9 : 1; В — CHCl_3 — EtOH , 8 : 2; Г — изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2. Электрофорез осуществляли на бумаге Whatman 3ММ в летучем буфере (рН 9) 0,01 М $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

1-(2',3',4'-Три-О-ацетил- α -L-арабинопиранозил)урацил (III). Суспензию сухого урацила (1,3 г, 11,5 ммоль) в гексаметилдисилазане (10 мл) и триметилхлорсилане (0,1 мл) кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха до полного растворения (~ 5 ч), упаривали в вакууме досуха и остаток растворяли в абс. дихлорэтаноле (40 мл). К раствору добавляли 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- α -L-арабинопиранозу (3,2 г, 10 ммоль) [13] и раствор SnCl_4 (1,2 мл, 10 ммоль) в 10 мл дихлорэтанола. Гомогенную смесь оставляли на 1 ч при 20°, добавляли 100 мл хлороформа и 100 мл насыщенного водного раствора NaHCO_3 . Органический слой отделяли, промывали последовательно водой (2×100 мл), насыщенным раствором NaHCO_3 (100 мл), водой (2×100 мл), сушили Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и наносили на колонку со 100 г силикагеля. Колонку промывали хлороформом (300 мл) и продукт элюировали 3% EtOH в хлороформе. Остаток (2,9 г) кристаллизовали из абс. спирта. Выход 2,6 г (70%). Т. пл. 126—128°. Найдено, %: С 48,53; Н 4,73. $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9$. Вычислено, %: С 48,65; Н 4,90. R_f 0,50 (А).

1-(α -L-Арабинопиранозил)урацил (IV). Соединение (III) (1,3 г, 3,5 ммоль) растворяли в метаноле, полунасыщенном аммиаком при 0° (20 мл), и оставляли на 20 ч при 20°, упаривали в вакууме, упаривали с водой (2×5 мл), водный раствор лиофилизировали и остаток кристаллизовали из абс. спирта. Выход 630 мг (74%). Т. пл. 253—254° (разл.). Найде-

коттон-эффекта при 265 нм циклофосфата (IX) объясняется образованием пятичленного цикла, что было отмечено ранее [3]. Спектры пиранозид (IV) и его 2'-фосфата (VII) отличаются как по форме, так и по амплитуде от спектров соединений (VIII) и (IX), причем наибольшая разница наблюдается в коротковолновой области (240—190 нм). Следует также отметить существенное увеличение положительного экстремума при 265 нм (B_{265} -полоса) в фосфате (VII) по сравнению с нефосфорилированным продуктом (IV).

Полученные данные согласуются с аддитивной схемой, рассмотренной в работе [3]. Из этой схемы следует, что в спектре КД соединения (VIII) положительный коттон-эффект при 265 нм должен быть примерно в 1,5 раза больше, чем коттон-эффект уридина, что и наблюдается экспериментально.

но, %: С 44,51; Н 5,06. $C_9H_{12}N_2O_6$. Вычислено, %: С 44,27; Н 4,95. R_f 0,11 (В). УФ-спектр: λ_{\max}^{pH1} 261 нм (ϵ 10 200), λ_{\max}^{pH7} 261 (10 300), λ_{\max}^{pH13} 260 (7500).

1-(3', 4'-О-Изопропилиден- α -L-арабинопиранозил)урацил (V). К суспензии соединения (IV) (500 мг, 2 ммоль) в сухом ацетоне (50 мл) прибавляли 1 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали 10 сут при 20°, упаривали в вакууме, к остатку прибавляли водный аммиак, упаривали досуха, остаток кристаллизовали из водного спирта (1 : 1). Выход 380 мг (68%). Т. пл. 270—271° (разл.). Найдено, %: С 51,02%; Н 5,71. $C_{12}H_{16}N_2O_6$. Вычислено, %: С 50,70; Н 5,67. R_f 0,31 (B); 0,72 (B).

β -Цианэтиловый эфир 1-(3', 4'-изопропилиден- α -L-арабинопиранозил)урацила-2'-фосфата (VI). Смесь соединения (V) (213 мг, 0,75 ммоль) и 1,5 мл 1 М раствора β -цианэтилфосфата в пиридине упаривали в вакууме досуха, вновь упаривали с абс. пиридином (3 \times 10 мл), растворяли в 10 мл абс. пиридина, добавляли 900 мг (3 ммоль) триизопропилбензолсульфохлорида и оставляли перемешиваться без доступа влаги воздуха на 3 ч при 20°. Прибавляли 20 мл воды, перемешивали 1 ч при 20°, триизопропилбензолсульфокислоту экстрагировали эфиром (2 \times 20 мл), водный слой разбавляли водой до 300 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, 1 л). Колонку промывали водой (1 л) и элюировали линейным градиентом бикарбоната аммония (0,00—0,06 М, общий объем 6 л). Соединение (VI) элюировалось при концентрации буфера 0,025—0,030 М. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5 \times 10 мл) и лиофилизировали. Выход 175 мг (54%). R_f 0,63 (Г). U_{pH} 0,55.

2'-Фосфат 1-(α -L-арабинопиранозил)урацила (VII). Соединение (VI) (152 мг, 0,35 ммоль) растворяли в 10 мл 1 М NaOH и через 5 мин при 20° быстро наносили на колонку с дауксом-50 (H^+ -форма, 30 мл). Продукт элюировали водой и лиофилизировали. Выход 110 мг (97%). R_f 0,26 (Г). U_{pH} 1,01. УФ-спектр: λ_{\max}^{pH1} 260 нм (ϵ 10 000), λ_{\max}^{pH7} 261 (10 100), λ_{\max}^{pH13} 259 (7300).

1'(R)- β -Оксиэтокси-1'-(урацилил-1)-2'(R), 3'-диоксипропан-2-фосфат (VIII). К раствору соединения (VII) (65 мг, 0,2 ммоль) в 3 мл воды добавляли раствор 53 мг (0,3 ммоль) $NaIO_4$ в 1 мл воды и оставляли смесь при 20° на 1 ч. К охлажденной до 0° реакционной смеси порциями добавляли 80 мг (2 ммоль) $NaNH_4$ и оставляли на 20 ч при 0°. Избыток $NaNH_4$ разлагали добавлением уксусной кислоты, затем прибавляли раствор аммиака до pH 8 и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, 1 л). Колонку промывали водой (1 л) и элюировали линейным градиентом бикарбоната аммония (0—0,2 М, 6 л). Соединение (VIII) элюировалось при концентрации буфера 0,11—0,12 М. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5 \times 10 мл) и лиофилизировали. Выход 58 мг (80%). U_{pH} 1,02. УФ-спектр: λ_{\max}^{pH1} 260 нм (ϵ 9900), λ_{\max}^{pH7} 260 (10 000), λ_{\max}^{pH13} 259 (7200).

2'3'-Циклофосфат 1'(R)- β -оксиэтокси-1'-(урацилил-1)-2'(R), 3'-диоксипропана (IX). Соединение (VIII) (46 мг, 0,14 ммоль) растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку с дауксом-50 (H^+ -форма, 5 мл). Свободную кислоту элюировали водой, упаривали в вакууме досуха, упаривали с абс. диметилформамидом (2 \times 10 мл), растворяли в 10 мл диметилформамида, добавляли 400 мг (2 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимид и оставляли перемешиваться на 30 мин при 20°. Затем прибавляли 50 мл воды, осадок фильтровали и промывали водой (2 \times 5 мл). Объединенные фильтраты разбавляли водой до 200 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, 1 л). Колонку промывали водой (1 л) и элюировали линейным градиентом бикарбоната аммония (0—0,05 М, 6 л). Соединение (IX) элюировалось при концентрации буфера 0,033—0,035 М. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5 \times 10 мл) и лиофилизировали. Выход 41 мг (90%). U_{pH} 0,60. УФ-спектр: λ_{\max}^{pH1} 260 нм (ϵ 9900), λ_{\max}^{pH7} 260 (10 000), λ_{\max}^{pH13} 259 (7000).

Периодатное окисление. Периодатное окисление соединений (IV) и (VII) проводили непосредственно в ампулах, использовавшихся для регистрации спектров ПМР. Вначале регистрировали спектр соединения (IV) (0,1 ммоль в 0,5 мл D₂O) (рис. 1а), затем спектры после добавления 0,1 ммоль (рис. 1б) и 0,2 ммоль NaIO₄ (рис. 1в). Спектр ПМР после добавления 0,1 ммоль NaIO₄ представлял собой суперпозицию спектра соединения (IV) и спектра соединения (IV) после добавления 0,2 ммоль NaIO₄. Соотношение количеств муравьиной кислоты, соединения (IV) и продукта его окисления, найденного интегрированием, было равно 1 : 1 : 1. После добавления 0,2 ммоль NaIO₄ происходило полное окисление соединения (IV) до муравьиной кислоты и диальдегида в соотношении 1 : 1 (рис. 1в): δ 8,25 (1H, с; HCOO⁻); 7,80 (1H, д, J 8,0; H-6); 5,94 (1H, д, J 8,0; 5-H); 5,70 (1H, д, J 4,0; 1'-H); 5,22 (1H, д, J 4,0; 2'-H); 5,23 (1H, т, J 4,6; 4'-H); 3,65 (1H, дд, J 4,6 и 11,0; 5'-а-H); 3,63 (1H, дд, J 4,6 и 11,0; 5' б-H).

Соединение (VII) окисляли аналогичным образом, спектр ПМР соединения (VII) приведен в таблице. Спектр ПМР после добавления 0,1 ммоль NaIO₄: δ 7,83 (1H, д, J 8,0; 6-H); 5,98 (1H, д, J 8,0; 5-H); 5,90 (1H, д, J 7,0; 1'-H); 4,41 (1H, о, J 7,0 и 2,0, J_{H,р} 10,0; 2'-H); 5,28 (1H, д, J 2,0; 3'-H); 5,20 (1H, т, J 5,0; 4'-H); 3,62 (2H, д, J 5,0; 5'-а- и 5'б- H).

Автор благодарит М. Я. Карпейского, В. Л. Флорентьева и Г. И. Яковлева за постоянный интерес к данной работе и ряд критических замечаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smrč J., Mikhailov S. N., Hynie S., Florentiev V. L. (1975) Collect. Czech. Chem. Commun., **40**, 3399—3403.
2. Mikhailov S. N., Kolobushkina L. I., Kritzyn A. M., Florentiev V. L. (1976) Tetrahedron, **32**, 2409—2415.
3. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин А. Ю., Падукова Н. Ш., Флорентьев В. Л. (1976) Биоорганич. химия, **2**, 1338—1350.
4. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Молекулярн. биология, **9**, 124—125.
5. Holý A., Cerna J., Rychlik I. (1974) Nucleic Acids Res., **1**, 1221—1231.
6. Kravetsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh V. P. (1975) Nucleic Acids Res., **2**, 2223—2236.
7. Аврамова З. В. (1975) Канд. дис. «Молекулярные основы специфичности панкреатической рибонуклеазы А». М.
8. Прасолов В. С., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 1226—1228.
9. Карабашян Л. В., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1976) Молекулярн. биология, **10**, 367—377.
10. Niedballa U., Vorbrüggen H. (1974) J. Org. Chem., **39**, 3654—3660.
11. Михайлов С. Н., Крицын А. М., Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2588—2591.
12. Крицын А. М., Колобушкина Л. И., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Химия гетероцикл. соедин., 125—131.
13. Hudson C. S., Dale J. K. (1918) J. Amer. Chem. Soc., **40**, 992—997.

Поступила в редакцию
24.VI.1977

После доработки
31.VIII.1977

NUCLEOTIDE CONFORMATIONAL ANALOGS. IV. SYNTHESIS OF 2'(R), 3'- DIHYDROXY-1'(R)-β-HYDROXYETHYL-1'(URACILYL-1)-PROPANE 2',3'-CYCLIC PHOSPHATE

MIKHAILOV S. N.

*Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Conformationally-free nucleotide analogs were prepared from 1-(α-L-arabinopyranosyl)uracil, the latter being obtained by glycosylation of bis-trimethylsilyluracil with 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-α-L-arabinopyranose in the presence of SnCl₄ and subsequent removal of protecting groups. 1-(α-L-Arabinopyranosyl)uracil-2'-phosphate was synthesized using isopropylidene protecting group and transformed by periodate oxidation, sodium borohydride reduction and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide cyclization into conformationally-free analog of uridine-2',3'-cyclic phosphate.