

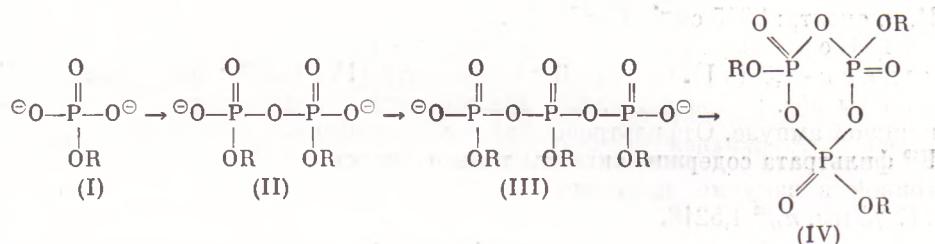
УДК 547.853+543.422.25

ХИМИЯ

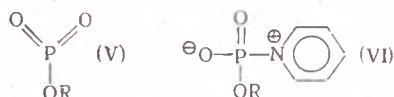
В. Ф. ЗАРЫТОВА, член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОПРЕ,  
А. В. ЛЕБЕДЕВ, А. С. ЛЕВИНА, А. И. РЕЗВУХИН

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ СИНТЕЗЕ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ Я.М.Р. НА  
ЯДРАХ  $P^{31}$

Несмотря на значительные успехи в химическом синтезе полинуклеотидов, механизм реакции образования межнуклеотидной связи остается мало изученным. Согласно Вейману и Корана (1), активной формой нуклеотидного компонента, непосредственно взаимодействующей с оксигруппой нуклеозидного компонента, является тринуклеозидтрифосфат IV, образующийся через несколько промежуточных стадий по брутто-схеме:



Рассматривается также возможность образования в качестве активной формы нуклеотидного компонента мономерного метаfosфата в свободном виде V или в виде пиридиниевого производного VI (2). Кинетических



данных практически не имеется, по-видимому, в силу отсутствия удобных методов регистрации промежуточных соединений и их высокой лабильности.

Настоящая работа посвящена изучению промежуточных реакций при синтезе олигонуклеотидов с помощью спектроскопии я.м.р. на ядрах  $P^{31}$ , которая позволяет различить все приведенные выше соединения без выделения их из реакционной смеси (3). В работе использовали 3'-O-ацетилтиимидин-5'-фосфат ( $pT-Ac$ ), 5'-O-тритилтиимидин ( $Tr-T$ ) и 5'-O-тритилтиимилил-(3'→5')-3'-O-ацетилтиимидин ( $Tr-TrT-Ac$ ), полученные по (4). В качестве конденсирующего реагента использовали триизопропилбензольсульфохлорид (ТПС) с содержанием активного хлора 98 % от теории, полученный по (5). Реакции проводили в пиридине, высушенному до содержания воды не более 0,05 %, который хранили над молекулярными ситами типа 4А. Электрофоретические подвижности определяли в 0,05 M триэтиламмоний бикарбонате, используя аппарат для высоковольтного электрофореза ВЭФА — 5—0,35. Спектры я.м.р.  $P^{31}$  записывали на многоядерном спектрометре НХ-90 с Фурье-преобразованием на ЭВМ ВNC-12 (фирма «Брукнер — Физик АГ», ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Количественный анализ результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100 %

сумму интегралов по всему спектру. Большинство спектров записано с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи  $P^{31}-\{H^1\}$ .

Спектры и химические сдвиги в мольных долях исходных веществ и промежуточных соединений относительно 85%  $H_3PO_4$  приведены на рис. 1. При действии 0,5 экв. ТПС на  $pT-Ac$  последний с большой скоростью переходит в пирофосфат II (рис. 1б), идентифицированный по химическому сдвигу и по электрофоретической подвижности ( $E_r=0,76$  относительно  $pT-Ac$ ) после разложения реакционной смеси водой. Добавление еще 0,5 экв. ТПС приводит к соединению A (рис. 1в) со спектром, состоящим из двух налагающихся дублетов с центром 11,5 м.д. и триплета (или

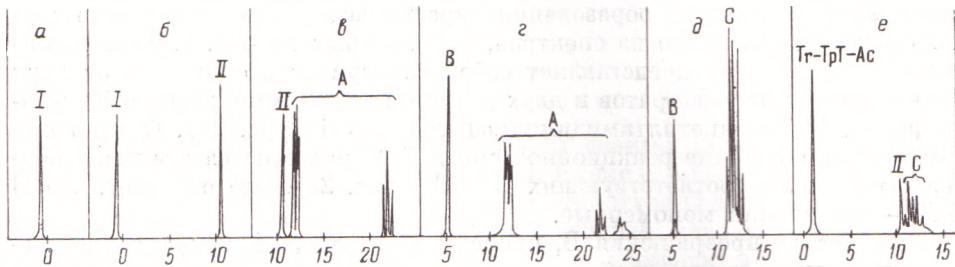


Рис. 1. Спектры я.м.р.  $P^{31}$  реакционных смесей: а — исходный  $pT-Ac$ ; б —  $pT-Ac+0,5$  экв. ТПС; в —  $pT-Ac+2$  раза по экв. ТПС; г —  $pT-Ac+3$  раза по 0,5 экв. ТПС; д — вещество B+Tr-T; е — вещество B+Tr-TpT. Реакции проводили в ампулах диаметром 10 мм при  $28^\circ$ , с концентрацией атомов Р 0,15 М. Для стабилизации резонансных условий использовали  $D_2O$  в качестве внешнего стандарта. Время одного накопления 0,7–0,8 сек. Запись спектров и обработку интерферограмм проводили после 100–500 накоплений

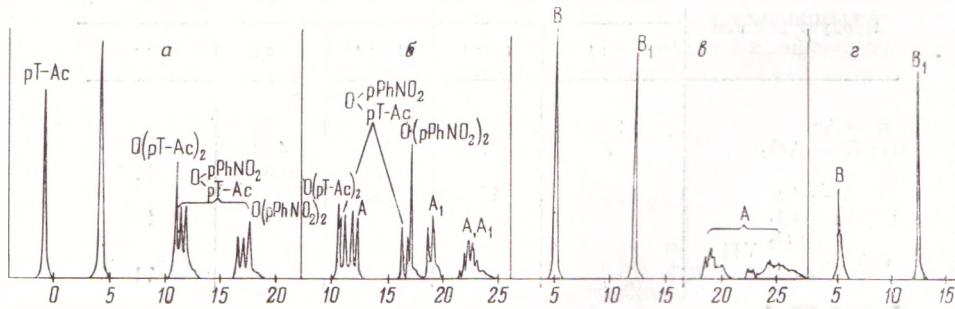


Рис. 2. Спектры реакционных смесей, полученных обработкой смеси эквивалентного количества  $pT-Ac$  и  $pPhNO_2$ : а — 0,5 экв. ТПС; б — 2 раза по 0,5 экв. ТПС; в — 3 раза по 0,5 экв. ТПС; г — то же без гетероядерного подавления спин-спиновой связи  $P^{31}-\{H^1\}$

дублета дублетов) с центром 21,6 м.д. и константой спин-спиновой связи  $P-O-P$  17 Гц в соотношении 2 : 1, в согласии со структурой III. При высыпывании реакционной смеси в эфир последующим электрофорезом зарегистрировано соединение с  $E_r=0,66$ . При обработке реакционной смеси, содержащей А, водой образуются  $pT-Ac$  и II в соотношении, близком к 1 : 2 в эквивалентах нуклеотидов. Таким образом, в начальной стадии процесс развивается в соответствии с механизмом, предложенным в (1).

Добавление еще 0,5 экв. ТПС приводит к превращению А в соединение В, спектр которого (рис. 1г) представляет собой синглет с химическим сдвигом 5,1 м.д. Ни форма, ни положение сигнала в спектре не соответствуют структуре IV. Химический сдвиг атомов Р, участвующих в образовании двух ангидридных связей, должен быть выше 20 м.д. аналогично неорганическому trimетафосфату (IV, R=H) (6) и среднему атому Р в А (III). Кроме того, поскольку структуре IV соответствуют два геометри-

ческих изомера, один из которых имеет неэквивалентные атомы Р, для нее можно ожидать более сложной структуры сигнала я.м.р. При действии ТПС на *n*-нитрофенилфосфат ( $p\text{PhNO}_2$ ) наблюдается аналогичная последовательность реакций, приводящая в итоге к соединению  $\text{B}_1$  со спектром, представляющим собой синглет с химическим сдвигом 12,2 м.д.

Для решения вопроса о числе атомов Р в соединениях  $\text{B}$  и  $\text{B}_1$  нами была проведена обработка ТПС смеси эквивалентных количеств рТ—Ас и  $p\text{PhNO}_2$ . В случае, если соединения типа  $\text{B}$  содержат несколько атомов Р, при совместной обработке обоих эфиров фосфорной кислоты должна была получиться смесь соединений, большая часть которых содержит одновременно остатки нуклеотида и *n*-нитрофенилфосфата. Это действительно имеет место на стадиях образования пирофосфата и тризамещенного триполифосфата, как видно из спектров, приведенных на рис. 2. Так, спектр смеси пирофосфатов представляет собой совокупность синглетов от двух симметричных пирофосфатов и двух дублетов от несимметричного  $\text{P}^1$ -*n*-нитрофенил,  $\text{P}^2$ -3'-О-ацетилтимидипирофосфата VII (рис. 2 $a$ ). Однако при дальнейшей обработке реакционной смеси ТПС появляются два нерасщепленных сигнала, соответствующих  $\text{B}$  и  $\text{B}_1$  (рис. 2 $b$ ). Это означает, что  $\text{B}$  и  $\text{B}_1$  — соединения мономерные.

Химические превращения  $\text{B}$ , приведенные в табл. 1, также свидетельствуют в пользу мономерной структуры. Образование А при взаимодействии  $\text{B}$  с небольшим избытком рТ—Ас можно рассматривать как результат

Таблица 1

Продукты взаимодействия  $\text{B}$  с нуклеофильными реагентами  
(выход в мол. %)

Продукт реакции	H <sub>2</sub> O + $\text{B}$	CH <sub>3</sub> OH + $\text{B}$	рT—Ac + $\text{B}$		pPhNO <sub>2</sub> + $\text{B}$
	200 : 1	100 : 1	1,5 : 1	3 : 1	1 : 1
рT—Ac	95				
O (рT—Ac) <sub>2</sub>	5	5	70	100	2
A			30	следы	17 *
МерT—Ac					
O (pPhNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>		95			10
O< pPhNO <sub>2</sub> VII					71

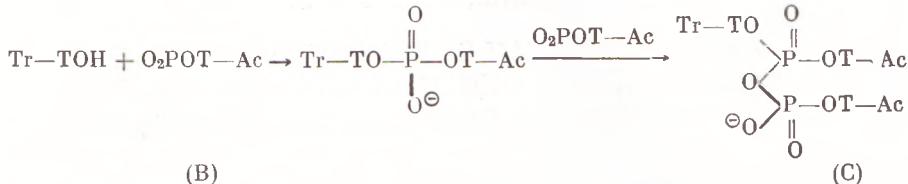
\* Образуется смесь триполифосфатов.

взаимодействия  $\text{B}$  с образовавшимся в качестве первичного продукта пирофосфатом. Все приведенные реакции проходят меньше чем за минуту, и уже при первой записи спектра после добавления нуклеофильного реагента не обнаруживается исходного  $\text{B}$ .

Спектр  $\text{B}$ , записанный без подавления спин-спиновой связи  $\text{P}^{31}$  — {H<sup>1</sup>}, представляет собой триплет с расщеплением 8,5 Гц, что соответствует расщеплению Р—O—C—H на двух протонах CH<sub>2</sub>-группы остатка тимидина. В аналогичном спектре  $\text{B}_1$  расщепление отсутствует (рис. 2 $g$ ). Это говорит против структуры VI, в случае которой должно было иметь место расщепление в результате спин-спинового взаимодействия Р—N—C—H порядка 10 Гц. Таким образом, из обсуждавшихся в литературе возможных структур активного производного мононуклеотидов полученные нами данные для основного компонента реакционной смеси — вещества  $\text{B}$  согласуются только со структурой 3'-О-ацетилтимидип-5'-метаfosфата V.

При добавлении к раствору  $\text{B}$  нуклеозидного компонента (TrT) наблюдается постепенное превращение  $\text{B}$  в вещество С, спектр я.м.р. которого представляет собой мультиплет в области 11—13 м.д., соответствующей

сигналам замещенных пирофосфатов (рис. 1 $\delta$ ). При обработке раствора С водой образуется Тг—ТрТ—Ас. Соединение со спектром, идентичным спектру С, образуется в первые же минуты при добавлении Тг—ТрТ—Ас к В (рис. 1 $e$ ). Это дает основание приписать С структуру Р<sup>1</sup>—5'-О-три-титимидин, Р<sup>1</sup>,Р<sup>2</sup>-бис-(3'-О-ацетилтимидин)-пирофосфата. По-видимому, при взаимодействии В с ТгТ в качестве первичного продукта образуется Тг—ТрТ—Ас, который быстро реагирует с В, образуя С. На образование С при этом расходуется два моля В



В силу того, что различие в химических сдвигах диэфиров и моноэфиров и константа спин-спинового взаимодействия Р—О—Р являются величинами одного порядка (<sup>3</sup>), предлагаемой структуре С должен соответствовать спектр системы типа АВ. Более сложный характер мультиплета, возможно, обусловлен существованием смеси изомеров в связи с затрудненным вращением вокруг связей Р—О. Этим же может объясняться некоторая неэквивалентность концевых атомов Р в триполифосфате А.

Поскольку выход Тг—ТрТ—Ас при действии Тг—Т на В может в итоге существенно превышать 50% по В, то С следует рассматривать так же, как активный фосфорилирующий агент. По структуре он аналогичен широко используемым в химии нуклеотидов Р<sup>1</sup>,Р<sup>1</sup>-дифенил,Р<sup>2</sup>-нуклеозидпирофосфатам (<sup>7</sup>). Можно ожидать, что при наличии в нуклеозидном или нуклеотидном компоненте фосфодиэфирных фрагментов, способных к быстрому взаимодействию с метафосфатом, тризамещенные пирофосфаты становятся основными фосфорилирующими агентами.

Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило  
23 IV 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. Weimann, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 84, 4329 (1962). <sup>2</sup> A. Michelson, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, М., 1966, стр. 344. <sup>3</sup> M. M. Crutchfield, C. H. Dungan et al., Topics in Phosphorus Chemistry, 5, N. Y.—London—Sydney, 1967. <sup>4</sup> P. T. Gilham, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 6212 (1958). <sup>5</sup> R. Lorman, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 88, 829 (1966). <sup>6</sup> M. M. Crutchfield, C. F. Callis et al., Inorg. Chem., 1, 813 (1962). <sup>7</sup> A. M. Michelson, Chem. and Ind., 1960, 1267.