

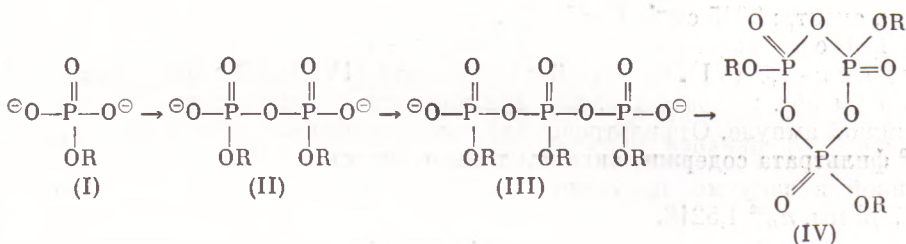
УДК 547.853+543.422.25

ХИМИЯ

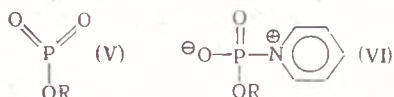
В. Ф. ЗАРЫТОВА, член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ,  
А. В. ЛЕБЕДЕВ, А. С. ЛЕВИНА, А. И. РЕЗВУХИН

# ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ Я.М.Р. НА ЯДРАХ P<sup>31</sup>

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 тринуклеозидтриметафосфат IV, образующийся через несколько промежуточных стадий по брутто-схеме:



Рассматривается также возможность образования в качестве активной формы нуклеотидного компонента мономерного метафосфата 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<sup>31</sup>, которая позволяет различить все приведенные выше соединения без выделения их из реакционной смеси (3). В работе использовали 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат (pT—Ac), 5'-О-трифосфатимидин (Tr—T) и 5'-О-трифосфатимидилил-(3'→5')-3'-О-ацетилтимидин (Tr—TrT—Ac), полученные по (4). В качестве конденсирующего реагента использовали триизопропилбензолсульфохлорид (ТПС) с содержанием активного хлора 98% от теории, полученный по (5). Реакции проводили в пиридине, высушенном до содержания воды не более 0,05%, который хранили над молекулярными ситами типа 4А. Электрофоретические подвижности определяли в 0,05 М триэтил-аммоний бикарбонате, используя аппарат для высоковольтного электрофореза ВЭФА — 5—0,35. Спектры я.м.р. P<sup>31</sup> записывали на многоядерном спектрометре НХ-90 с Фурье-преобразованием на ЭВМ ВНС-12 (фирма «Брукер — 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 рТ—Ас последний с большой скоростью переходит в пирофосфат II (рис. 1б), идентифицированный по химическому сдвигу и по электрофоретической подвижности ( $E_f=0,76$  относительно рТ—Ас) после разложения реакционной смеси водой. Добавление еще 0,5 экв. ТПС приводит к соединению А (рис. 1в) со спектром, состоящим из двух налагающихся дублетов с центром 11,5 м.д. и триплета (или

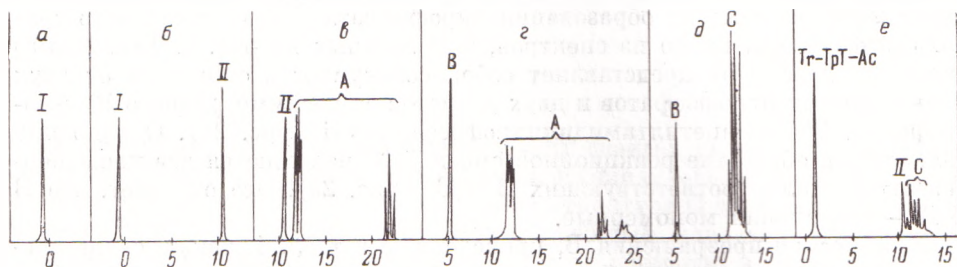


Рис. 1. Спектры я.м.р.  $P^{31}$  реакционных смесей: а — исходный рТ—Ас; б — рТ—Ас + 0,5 экв. ТПС; в — рТ—Ас + 2 раза по экв. ТПС; г — рТ—Ас + 3 раза по 0,5 экв. ТПС; д — вещество В + Тг—Т; е — вещество В + Тг—ТрТ. Реакции проводили в ампулах диаметром 10 мм при 28°, с концентрацией атомов Р 0,15 М. 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

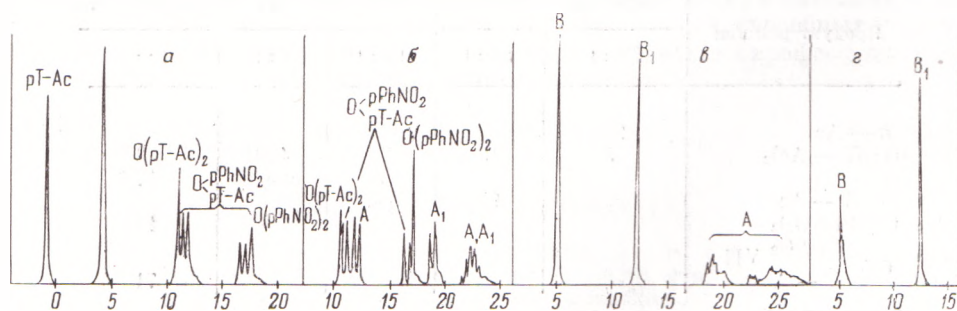


Рис. 2. Спектры реакционных смесей, полученных обработкой смеси эквивалентного количества рТ—Ас и  $pPhNO_2$ : а — 0,5 экв. ТПС; б — 2 раза по 0,5 экв. ТПС; в — 3 раза по 0,5 экв. ТПС; г — то же без гетероядерного подавления спин-спиновой связи  $P^{31}-\{H^1\}$

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 высаживании реакционной смеси в эфир последующим электрофорезом зарегистрировано соединение с  $E_f=0,66$ . При обработке реакционной смеси, содержащей А, водой образуются рТ—Ас 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 триметафосфату (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 В, со спектром, представляющим собой синглет с химическим сдвигом 12,2 м.д.

Для решения вопроса о числе атомов Р в соединениях В и В<sub>1</sub> нами была проведена обработка ТПС смеси эквивалентных количеств  $p\text{T}-\text{Ac}$  и  $p\text{PhNO}_2$ . В случае, если соединения типа В 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 Р'-*n*-нитрофенил, Р<sup>2</sup>-3'-О-ацетилтимидинпирофосфата VII (рис. 2а). Однако при дальнейшей обработке реакционной смеси ТПС появляются два нерасщепленных сигнала, соответствующих В и В<sub>1</sub> (рис. 2в). Это означает, что В и В<sub>1</sub> — соединения мономерные.

Химические превращения В, приведенные в табл. 1, также свидетельствуют в пользу мономерной структуры. Образование А при взаимодействии В с небольшим избытком  $p\text{T}-\text{Ac}$  можно рассматривать как результат

Таблица 1  
Продукты взаимодействия В с нуклеофильными реагентами  
(выход в мол. %)

Продукт реакции	$\text{H}_2\text{O} + \text{B}$	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{B}$	$p\text{T} - \text{Ac} + \text{B}$		$p\text{PhNO}_2 + \text{B}$
	200 : 1	100 : 1	1,5 : 1	3 : 1	1 : 1
$p\text{T} - \text{Ac}$	95				
$\text{O} (p\text{T} - \text{Ac})_2$	5	5	70	100	2
А			30	следы	17 *
$\text{Me}p\text{T} - \text{Ac}$		95			
$\text{O} (p\text{PhNO}_2)_2$					10
$\text{O} \begin{cases} p\text{PhNO}_2 \\ p\text{T} - \text{Ac} \end{cases} \text{ VII}$					71

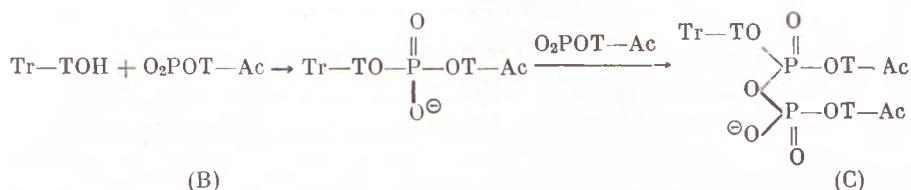
\* Образуется смесь триполифосфатов.

взаимодействия В 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 В.

Спектр В, записанный без подавления спин-спиновой связи  $\text{P}^{31} - \{\text{H}^1\}$ , представляет собой триплет с расщеплением 8,5 гц, что соответствует расщеплению  $\text{P}-\text{O}-\text{C}-\text{H}$  на двух протонах  $\text{CH}_2$ -группы остатка тимидина. В аналогичном спектре В<sub>1</sub> расщепление отсутствует (рис. 2з). Это говорит против структуры VI, в случае которой должно было иметь место расщепление в результате спин-спинового взаимодействия  $\text{P}-\text{N}-\text{C}-\text{H}$  порядка 10 гц. Таким образом, из обсуждавшихся в литературе возможных структур активного производного моонуклеотидов полученные нами данные для основного компонента реакционной смеси — вещества В согласуются только со структурой 3'-О-ацетилтимидин-5'-метафосфата V.

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

сигналам замещенных пирофосфатов (рис. 1*д*). 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*е*). Это дает основание приписать С структуру Р<sup>1</sup>—5'—О-триптилтимидин, 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> А. Микельсон, 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.