

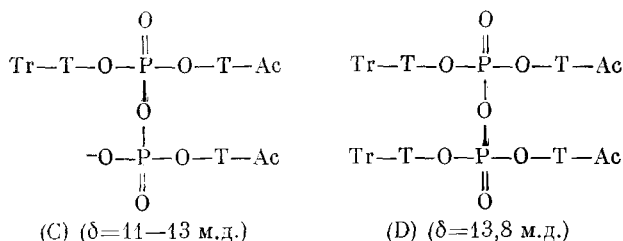
УДК 547.963.32+543.422.25

ХИМИЯ

А. Г. БАДАШКЕЕВА, В. Ф. ЗАРЫТОВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, А. В. ЛЕБЕДЕВ, Т. Н. ШУБИНА

АКТИВНЫЕ ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ДИНУКЛЕОТИДОВ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОМ СИНТЕЗЕ

Ранее с использованием импульсной я.м.р. спектроскопии на ядрах ^{31}P нами было показано, что при действии триизопропилбензолсульфохлорида (ТПС) на мононуклеотид образуется активное фосфорилирующее производное — соединение В с химическим сдвигом $\delta=5,1$ м.д., предварительно идентифицированное как нуклеозид-5'-метафосфат ($^{1-3}$). Последовательное взаимодействие двух молекул В с нуклеозидной компонентой (5'-три-тилтимидин, $\text{Tr}-\text{T}$) сначала по оксигруппе, а затем по фосфорильной группе образовавшегося динуклеозидфосфата приводит к образованию тризамещенного пирофосфата С (4). При этом соединение С, будучи активным фосфорилирующим реагентом по отношению к аминам, мало реакционно-способно в олигонуклеотидном синтезе. При действии ТПС на динуклеозидфосфат (тритилтимидил- $(3' \rightarrow 5')$ -ацетилтимидин, $\text{Tr}-\text{TrT}-\text{Ac}$) главным продуктом реакции является тетразамещенный пирофосфат D (5).



Соединение D также является фосфорилирующим агентом и может образовывать триэфиры фосфорной кислоты.

В настоящей работе исследованы производные динуклеотида 3'-ацетилдтитимидилата $\text{pTrT}-\text{Ac}$, образующиеся при действии на него ТПС и их взаимодействие с некоторыми нуклеофильными агентами.

В работе использовали $\text{pTrT}-\text{Ac}$, полученный по (6), $\text{Tr}-\text{T}$, полученный по (7), ТПС, полученный по (8), перегнанные анилин и циклогексил-амин марки х.ч. Все реакции проводили при комнатной температуре в безводном пиридине с содержанием влаги не более 0,02%, полученном по (3). Для разделения реакционной смеси использовали нисходящую хроматографию на бумаге FN-1 в системе растворителей: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}-1 \text{ M}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (7:3) pH 7,5. Спектры я.м.р. ^{31}P записывали на многоядерном импульсном спектрометре НХ-90 с Фурье преобразованием на ЭВМ В NC-12 фирмы «Брукер-Физик АГ» на частоте 36,43 Мгц. Все спектры записаны с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи $\{^1\text{H}\}-^{31}\text{P}$. Химические сдвиги приведены (м.д.) относительно 85% H_3PO_4 . Детали эксперимента см. (3).

На рис. 1 приведены спектры я.м.р.— ^{31}P реакционных смесей, полученных обработкой $\text{pTrT}-\text{Ac}$ различными избытками ТПС в безводном пиридине. Видно, что уже при добавлении 0,5 экв. ТПС (рис. 1а) наряду с

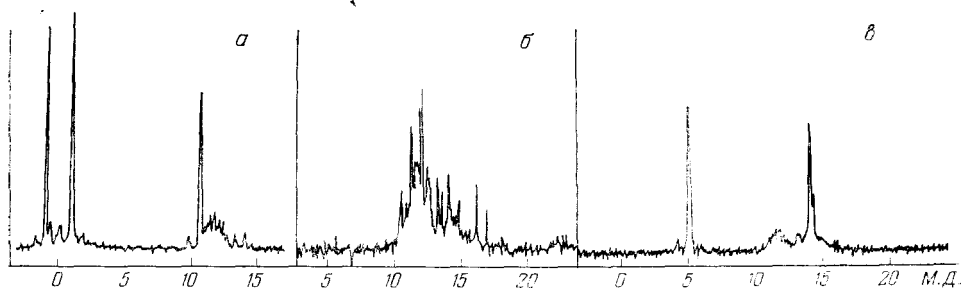


Рис. 1. Спектры я.м.р. ^{31}P реакционных смесей, полученных при обработке рТрТ—Ас: а — 0,5 экв. ТПС, б — 1,5 экв. ТПС, в — 5 экв. ТПС

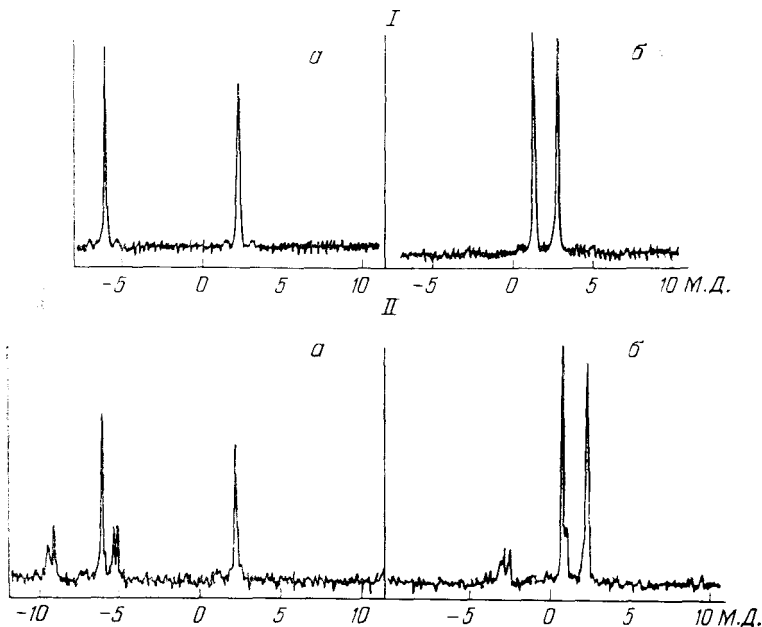


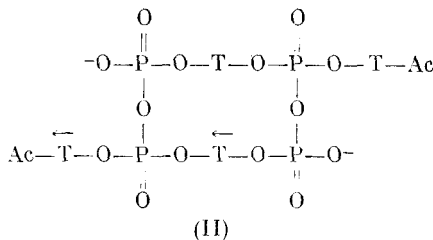
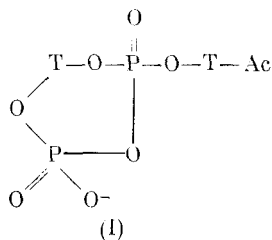
Рис. 2. Спектры я.м.р. ^{31}P реакционных смесей, полученных при обработке рТрТ—Ас 1,5 экв. (I) и 5 экв. (II) ТПС после добавления циклогексиламина (а) и анилина (б)

сигналами кондового атома Р (P_K) и межнуклеотидного атома Р (P_M) регистрируется синглет с $\delta=10,6$ м.д., отвечающий симметричной дизамещенной пирофосфатной группе и мультиплет в области 11—13 м.д., характерной для фрагментов типа С ⁽⁴⁾. Это означает, что уже на первой стадии процесса происходят реакции, затрагивающие межнуклеотидную фосфодиэфирную группу. При действии 1,5 экв. ТПС сложный сигнал в этой области является основным компонентом спектра (рис. 1б). В обоих случаях не зарегистрировано сигнала типа В в области 5 м.д. Появление сигнала в этой области имеет место только при использовании значительных избытков ТПС (5 экв., рис. 1в). При этом наряду с синглетом при 5,5 м.д. в спектре существенно вырастает сигнал при 14,2 м.д., где можно ожидать резонанса атомов P_M , участвующих в образовании тетразамещенного пирофосфатного фрагмента типа D ⁽⁵⁾.

По аналогии с предыдущими данными ⁽⁴⁾ можно было ожидать, что фрагменты типа С должны реагировать с сильными нуклеофилами, образуя продукты превращения по концевому атому Р. На рис. 2 приведены также спектры реакционной смеси, полученной действием на рТрТ—Ас 1,5 экв. ТПС, после добавления циклогексиламина (рис. 2а) и анилина (рис. 2б). В обоих случаях сложный спектр, приведенный на рис. 1б превращается в

спектр, состоящий из двух синглетов, один из которых в обоих случаях отвечает межнуклеотидному атому Р_м ($\delta=2,1$ м.д.). Второй сигнал в случае добавления циклогексилamina имеет $\delta=-5,8$ м.д., что хорошо согласуется со значением, ожидаемым для циклогексиламида по концевому фосфату (для C₆H₁₁NH—pT—Ac ранее найдено $\delta=-4,9$ м.д.). По аналогии сигнал с $\delta=0,6$ м.д., полученный при обработке той же реакционной смеси анилином, можно отнести к концевому атому Р, образующему фосфоанилидную группу.

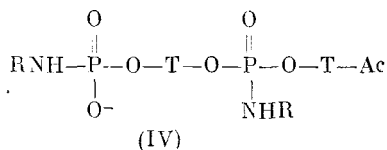
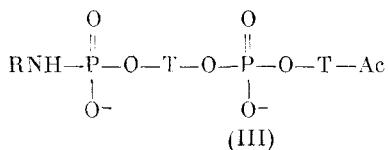
Это свидетельствует об образовании при небольших избытках ТПС в качестве основного продукта соединений с тризамещенной пирофосфатной группой, которая может образовываться как в пределах одной молекулы исходного динуклеотида, так и с участием двух и большего числа молекул с образованием циклических структур типа I, II или более сложных циклов



$\bar{T}$ — остаток тимидина с 5'-оксигруппой справа и 3'-оксигруппой слева.

По аналогии со свойствами С можно было ожидать, что I и II будут мало реакционноспособны в олигонуклеотидном синтезе. Добавление к реакционной смеси, полученной действием на pTrT—Ac 1,5 экв. ТПС, 2 экв. Tr—T, взятого в качестве нуклеозидного компонента, и выдерживание смеси в течение 23 час. до полного исчезновения сигналов в области фрагментов типа С привело к образованию тринуклеозиддифосфата Tr—TrTrT—Ac с выходом всего 30%.

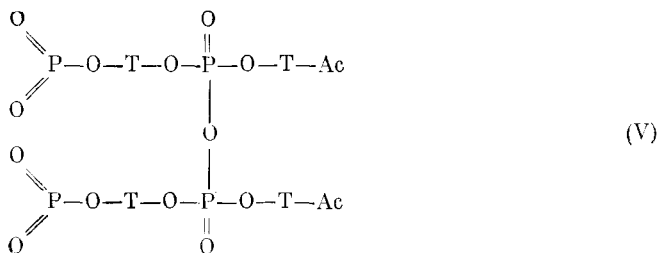
В отличие от опытов с небольшим количеством ТПС в спектре я.м.р. реакционной смеси, полученной с 5-кратным избытком ТПС (рис. 1а), наблюдаются сигналы при 5,5 и 14,2 м.д., что свидетельствует о присутствии фрагментов типа В и D соответственно. На рис. 2 II приведены спектры я.м.р. ³¹P этой смеси после добавления циклогексилamina (рис. 2II, а) и анилина (рис. 2II, б). В случае циклогексилamina наряду с синглетными сигналами, соответствующими амиду концевого фосфата и межнуклеотидному атому Р, т. е., соединению структуры III, наблюдаются расщепленные сигналы, которые по величине химического сдвига соответствуют межнуклеотидной ($\delta=-8,9$ м.д.; ср. $\delta=-9,0$ м.д. для циклогексиламида Tr—TrT—Ac ⁽³⁾) и концевой ($-4,9$ м.д.) фосфоамидным группам. Эти сигналы резонно приписать соединению IV (R-циклогексил). Расщепление сигналов, вероятно, связано с существованием IV в форме двух диастереоизомеров в результате наличия асимметричного межнуклеотидного атома Р ⁽⁹⁾



Аналогично можно интерпретировать спектр, приведенный на рис. 2II, б.

Образование амида фосфодиэфира свидетельствует, что в активном производном, содержащем фрагмент типа В, одновременно присутствует тет-

разамещенная пирофосфатная группа. Простейшая мыслимая структура такого производного имеет вид:



По аналогии с соединением В, производным мононуклеотида, производное типа V оказалось активным фосфорилирующим реагентом в олигонуклеотидном синтезе. Добавление к реакционной смеси, полученной обработкой рТрТ—Ас 5 экв. ТПС, двух эквивалентов Тг—Т в качестве нуклеозидной компоненты привело через 19 час. к 80%, а через 42 часа к количественному превращению нуклеотидного компонента в тринуклеозиддифосфат Тг—ТрТрТ—Ас.

Дополнительный анализ реакционных смесей (см. рис. 2I, б и II, б) методом нисходящей бумажной хроматографии обнаружили наличие одного вещества с R_f 0,71 (I, б) или двух веществ с R_f 0,71 и R_f 0,81 (II, б), которые после удаления ацетильной группы и последующей обработки фосфодиэстеразой змеиного яда были идентифицированы как $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHrTrT—Ac}$ (R_f 0,71) и $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHrTr}(\text{NHC}_6\text{H}_5)\text{T—OAc}$ (R_f 0,81). Идентификация синтезированного ТгТрТрТ—Ас была проведена дополнительно методом бумажной и ионообменной хроматографии в системе Томлинсона — Теннера в микромасштабе.

Таким образом, динуклеотид способен образовывать, по крайней мере, два типа активных фосфорилирующих производных. При небольших избытках образуется производное, содержащее фрагменты типа С, мало реакционноспособные в олигонуклеотидном синтезе. При больших избытках ТПС образуется высоко реакционноспособное производное, содержащее метафосфатную группу, и одновременно активированную фосфодиэфирную группу.

Соединение этого типа дает высокий выход целевого продукта в олигонуклеотидном синтезе, однако требует применения высокого избытка ТПС (5-кратного вместо 1,5-кратного по теории), что может привести к нежелательным побочным процессам⁽⁶⁾. Поскольку реакция производного типа V с Тг—Т проводилась в присутствии избытка непрореагировавшего ТПС, полученные результаты не позволяют количественно сопоставить реакционную способность форм V и I, II и для такого сопоставления нужны дополнительные кинетические данные.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
18 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., ДАН, т. 212, 630 (1973). ² D. G. Knorre, A. V. Lebedev et al., Tetrahedron, v. 30, 3073 (1974). ³ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, № 2, 1, 85 (1974). ⁴ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, № 7, в. 3, 121 (1974). ⁵ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, № 7, в. 3, 126 (1974). ⁶ H. Kössel, M. W. Moon, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., v. 89, 2148 (1967). ⁷ P. T. Gilham, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., v. 80, 6212 (1958). ⁸ R. Lohmann, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., v. 88, 829 (1966). ⁹ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, № 4, в. 2 (1975); А. В. Лебедев, А. И. Резвухин, Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, № 4, в. 2 (1975).