



УДК 547.963:32:542.953.2

**ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ
АКТИВНОГО ПРОИЗВОДНОГО МОНОНУКЛЕОТИДА, ОТДЕЛЕННОГО
ОТ ПОЛИСТИРОЛЬНОГО КОНДЕНСИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА*****Туркин С. И., Потанов В. К., Шабарова З. А.,
Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.***Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,**Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Показано, что при взаимодействии $dpT(As)$ с поперечно сшитым ПСС образуется активное фосфорилирующее производное В, которое после отделения от полимера реагирует с морфолином с образованием морфолида $dpT(As)$, а с $d(Tr)T$ — с образованием $R^1-(5'-O-тригилтимидин)-R^1, R^2$ -бис-(3'-O-ацетилтимидин)-пирофосфата. С использованием соединений В, полученных из $dpT(As)$ или $dpanC(As)$, в реакции с $d(MeOTr)T$ осуществлен с выходом 75% синтез динуклеозидфосфатов $d[(MeOTr)T-T(As)]$ и $d[(MeOTr)T-anC(As)]$.

В качестве конденсирующих реагентов в химическом синтезе олигонуклеотидов наиболее широко используются арилсульфохлориды, главным образом триизопропилбензолсульфохлорид. При этом обеспечиваются достаточно высокие выходы и скорость синтеза по крайней мере при получении коротких олигонуклеотидов. Принципиальным недостатком этих реагентов является их способность к атаке межнуклеотидных фосфатных групп, что в конечном итоге приводит к ряду нежелательных побочных процессов [1—3]. Арилсульфохлориды могут также взаимодействовать с оксигруппой нуклеозидного компонента с образованием сульфонилированных продуктов [4, 5]. Кроме того, накопление значительного количества арилсульфокислоты усложняет разделение реакционной смеси, а при попадании следов влаги может привести к частичному отщеплению используемых в синтезе кислотоллабильных защитных групп [6].

Ранее было показано, что конечным продуктом взаимодействия мононуклеотида с триизопропилбензолсульфохлоридом является активное мономерное производное нуклеотида В (предположительно нуклеозид-5'-метафосфат), способное к взаимодействию с нуклеозидным компонентом с образованием межнуклеотидной связи [7, 8]. Мы нашли также, что производное В накапливается в растворе при взаимодействии нуклеозида с ПСС, что позволяет разделить стадии образования активного фосфорилирующего производного нуклеозида и его взаимодействия с нуклеозидным компонентом. В результате открывается возможность полностью из-

* В работе приняты сокращения в соответствии с рекомендациями IUPAC — IUB, например $d[(MeOTr)T-anC(As)]$ — 5'-O-(*n*-метокситритил)-тимидилил-(3' → 5')-3'-O-ацетил-4-апицилдезоксицитидин. Кроме того, ПСС — полистиролсульфохлорид.

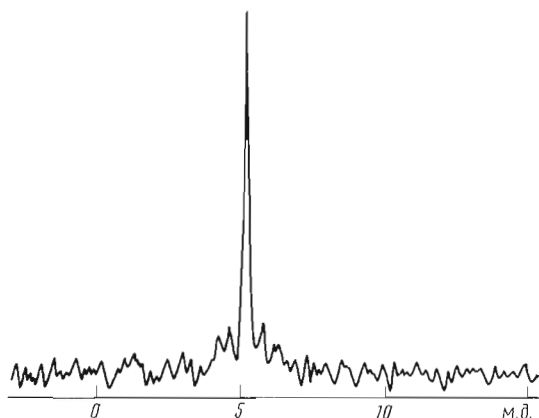


Рис. 1. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, содержащей 0,92 ммоль $d\text{PrT(As)}$ и 6-кратный избыток ПСС через 20 ч

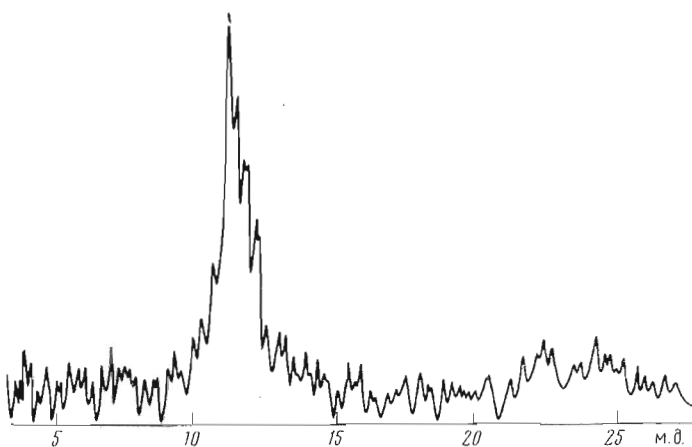


Рис. 2. Спектр ^{31}P -ЯМР той же смеси после добавления 0,5 ммоль $d(\text{Tr})\text{T}$ через 3,5 ч

бежать контакта нуклеозидного компонента как с арилсульфохлоридом, так и с арилсульфокислотой и тем самым преодолеть большинство из указанных выше недостатков арилсульфохлоридов как конденсирующих агентов.

В настоящей работе исследована принципиальная возможность использования производного В, отделенного от конденсирующего реагента, для химического синтеза олигонуклеотидов на примере синтеза динуклеозидфосфатов. За образованием соединения В следили с помощью ЯМР на ядрах ^{31}P . Поскольку это соединение чрезвычайно быстро реагирует с нуклеофилами, отделение его от полимера должно проводиться в условиях, исключающих попадание даже следовых количеств воды. Спектр ^{31}P -ЯМР соединения В приведен на рис. 1. Прибавление к продукту В избытка морфолина приводит к мгновенному и практически количественному превращению в морфолид нуклеотида и изменению химического сдвига сигнала ЯМР от 5 до $-5,5$ м. д.

При добавлении нуклеозидного компонента $d(\text{Tr})\text{T}$ к пиридиновому раствору соединения В, полученного с помощью ПСС и отделенного от полимера, происходит реакция с образованием межнуклеотидной связи. При этом в спектре ^{31}P -ЯМР исчезает сигнал при 5 м. д. и появляется сложный мультиплет в области 11—13 м. д. и группа сигналов в области 23—25 м. д. (рис. 2).

Аналогичные спектры наблюдались при взаимодействии с $d(\text{Tr})\text{T}$ и соединения В, полученного с помощью триизопропилбензолсульфохлорида, хотя мультиплет при 11—13 м. д. в этом случае был лучше разрешен [10]; этот мультиплет был отнесен к тризамещенному P^1 -5'-О-тримитимидин- P^1 , P^2 -бис-(3'-О-ацетилтимидин)-5'-пирофосфату, образующемуся путем последовательного присоединения двух молекул производного В, сначала по оксигруппе нуклеозидного компонента и затем к образовавшейся фосфодиэфирной группе.

Используя отделенный от ПСС пиридиновый раствор производного В, мы осуществили синтез двух динуклеозидфосфатов. Для этого $\text{dpanC}(\text{Ac})$ или $\text{drT}(\text{Ac})$ обрабатывали избытком ПСС, отделяли раствор от полимера и добавляли его к нуклеозидному компоненту, $d(\text{MeOTr})\text{T}$ (соотношение нуклеозид: соединение В, 1 : 2). Анализ реакционных смесей после выдерживания в течение 6 ч, проведенный методом БХ, показал, что соответствующие динуклеозидфосфаты, $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{anC}(\text{Ac})]$ и $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{T}(\text{Ac})]$, образуются с выходом 75% по нуклеозидному компоненту.

Экспериментальная часть

В работе использовали $\text{drT}(\text{Ac})$ [11] и $\text{dpanC}(\text{Ac})$ [12], полученные из соответствующих мононуклеотидов производства Опытного химического цеха НИИОХ СО АН СССР.

Восходящую БХ проводили на бумаге FNI в системе ацетонитрил — вода (92 : 8). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-16.

Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P измеряли на ЯМР-спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (фирма «Brucker — Physic — АС», ФРГ) на частоте 36,43 МГц с подавлением гетероядерного спин-спинового взаимодействия $^{31}\text{P} - \{^1\text{H}\}$. Химические сдвиги приведены относительно H_3PO_4 как внешнего стандарта. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл, концентрация $^{31}\text{P} - 0,1 \text{ M}$.

Синтез полистиролсульфохлорида. а) Исходный полимер получали сополимеризацией стирола (54%) со смесью *n*-дивинилбензола (25%) и винилэтилбензола (21%) в присутствии мезитилена (60% от смеси мономеров). В качестве инициатора полимеризации использовали динитрил азо-бис-изомасляной кислоты (1%). Водная фаза — 5%-ный раствор крахмала. Соотношение водной и масляной фаз 5 : 1. Полимеризацию проводили при температуре 65° (3 ч), затем при 75° (10 ч) и при 90° (1 ч). Полимер тщательно отмывали на фильтре горячей водой, спиртом и экстрагировали бензолом в аппарате Сокслета.

б) В четырехгорлую колбу (1 л), снабженную мешалкой, термометром, капельной воронкой и воздушным холодильником с хлоркальциевой трубкой, помещали 350 мл полимера, отмытого на фильтре сухим хлороформом (65 г ~ 0,5 моль высушенного сополимера), 200 мл хлороформа и смесь охлаждали до +2°. При перемешивании добавляли 100 мл (179 г, 1,4 мол.) хлорсульфоновой кислоты в 100 мл хлороформа, поддерживая температуру в пределах 5—7°. Смесь перемешивали в течение ночи при 20°, затем переносили в колонку (6 × 30 см) с фильтром и пропускали через полимер еще 50 мл хлорсульфоновой кислоты в 100 мл хлороформа и отмывали 500 мл сухого хлороформа. Полимер переносили на воронку с фильтром, отмывали ледяной водой (до отсутствия кислой реакции), диоксаном, эфиром и высушивали в вакууме. Выход 120 г, содержание сульфохлоридных групп, определенное методом количественной ИК-спектроскопии и кондуктометрическим титрованием, 5—5,5 ммоль на 1 г сухого полимера.

Получение производного В. В реакционном сосуде [9] в 10 мл пиридина растворяли 0,92 ммоль пиридиниевой соли $\text{drT}(\text{Ac})$ и добавляли 6-кратный избыток ПСС. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке

и через определенные промежутки времени отфильтровывали пробу (~1,5 мл) в ампулу для записи спектра ^{31}P -ЯМР, заполненную сухим аргоном. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси через 20 ч приведен на рис. 1.

Для определения отсутствия связывания нуклеотида полимерсульфо-хлоридом после отделения раствора соединения В полимер отмывали абсолютным пиридином и гидролизовали водным пиридином. Водно-пиридиновый фильтрат упаривали несколько раз досуха с водным раствором карбоната аммония. Осадок растворяли в воде и анализировали методом электрофореза на бумаге. На электрофореграмме не обнаружено УФ-поглощающих пятен.

Синтез $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{T}(\text{Ac})]$. Активное производное В получали при взаимодействии 7,5 мг (17 мкмоль) $\text{dpT}(\text{Ac})$ и 200 мг (1,1 ммоль) ПСС в 10 мл пиридина при комнатной температуре в течение 6 ч. Отделенный от полимера раствор добавляли к 4,7 мг (8 мкмоль) $d(\text{MeOTr})\text{T}$ и выдерживали в течение 6 ч. Выход динуклеозидфосфата $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{T}(\text{Ac})]$ 75% (по данным БХ).

Синтез $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{anC}(\text{Ac})]$. Активное производное В получали исходя из 9,6 мг (17 мкмоль) $\text{dpanC}(\text{Ac})$ и 200 мг (1,1 ммоль) ПСС. Реакционную смесь выдерживали в течение 6 ч при комнатной температуре. Отделенный от полимера раствор добавляли к 4,7 мг (8 мкмоль) $d(\text{MeOTr})\text{T}$, выдерживали 6 ч и анализировали с помощью БХ: для $\text{dpanC}(\text{Ac})$ R_f 0,1; для $d(\text{MeOTr})\text{T}$ R_f 0,9 и для $d[(\text{MeOTr})\text{T}-\text{anC}(\text{Ac})]$ R_f 0,75. Выход динуклеозидфосфата 75% (по данным БХ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nachmann J., Khorana H. G. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 91, 2749—2757.
2. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikehara M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2296—2301.
3. 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, 126—131.
4. Lohrmann R., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 829—833.
5. Rubinstein M., Patchornik A. (1972) Tetrahedron Letters, 28, 2881—2884.
6. Бадашкеева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Шубина Т. Н. (1975) Био-орган. химия, 1, 293—299.
7. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Resvukhin A. I., Zaritova V. F. (1974) Tetrahedron, 30, 3073—3079.
8. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1973) Докл. АН СССР, 212, 630—633.
9. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Потапов В. К., Резвухин А. И., Туркин С. И., Шабарова З. А. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 9, 152—155.
10. 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, 121—125.
11. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6222.
12. Khorana H. G., Turner A. E., Vizsolyi I. P. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 686—691.

Поступила в редакцию
6.III.1975

THE USE AN ACTIVE MONONUCLEOTIDE DERIVATIVE SEPARATED FROM POLYSTYRENE CONDENSING REAGENT IN THE DINUCLEOSIDE PHOSPHATE SYNTHESIS

TURKIN S. I., POTAPOV V. K., SHABAROVA Y. A.,
ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G.

Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow, Institute of Organic Chemistry, Siberian
Division Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

It is shown that an active phosphorylating derivative В formed due to interaction of $d[\text{pT}(\text{Ac})]$ with cross-linked polystyrene sulphonyl chloride ($\text{Ps-SO}_2\text{Cl}$) separated from the polymer reacts with morpholine forming $d[\text{pT}(\text{Ac})]$ morpholine and with $d(\text{Tr-T})$ forming P^1 -(5'-O-tritylthymidine)- P^1 , P^2 -bis-(3'-O-acetylthymidine)-pyrophosphate. Using pyridine solution of the active derivative of $d[\text{pT}(\text{Ac})]$ or $d[\text{panC}(\text{Ac})]$ in the reaction with $d(\text{MeOTr-T})$ the synthesis of $d[\text{MeOTr-TpT}(\text{Ac})]$ and $d[(\text{MeOTr})\text{TranC}(\text{Ac})]$ as performed with a 75% yield.