



УДК 577.113.6.088.3:543.544

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВII*. СООТНЕСЕНИЕ КОНФИГУРАЦИИ ПРИ АТОМАХ ФОСФОРА
В ДИАСТЕРЕОМЕРАХ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ОЛИГОТИМИДИЛАТОВ

Абрамова Т. В., Комарова Н. И., Лебедев А. В., Тагай С. А.

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Предложена и экспериментально подтверждена схема синтеза этиловых эфиров олиготимидилатов, позволяющая в сочетании с ВЭЖХ соотносить в олигомерах конфигурации при различных межнуклеотидных триэфирных атомах фосфора. Схема апробирована на примере синтеза этиловых эфиров три- и тетрагетимидилатов (Tr)Tr(Et)Tr(Et)T и (Tr)Tr(Et)Tr(Et)Tr(Et)Tr(ClPh). Для полученных индивидуальных диастереомеров этих соединений определены конфигурации всех межнуклеотидных этилфосфатных фрагментов относительно ранее синтезированных диастереомеров Tr'(Et)T и Tr''(Et)T.

Известно, что индивидуальные диастереомеры неионных аналогов олигонуклеотидов образуют разные по устойчивости комплексы с комплементарными им олиго- и полинуклеотидами [2-4]. Для понимания причин различной стабильности таких комплексов, а также для установления их пространственного строения необходимо знать абсолютные конфигурации при межнуклеотидных атомах фосфора в этих соединениях. Эту задачу можно решить с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Недавно была определена абсолютная конфигурация при межнуклеотидном атоме фосфора одного из диастереомеров метилфосфонатного аналога ApT [5]. Однако использование метода рентгеноструктурного анализа для более длинных неионных аналогов олигонуклеотидов представляется затруднительным. Информацию об абсолютной конфигурации при всех асимметричных атомах фосфора в олигонуклеотиде можно получить, зная абсолютную конфигурацию при атоме фосфора в каком-либо одном фрагменте молекулы и соотношение конфигураций при всех остальных атомах фосфора молекулы.

В настоящей работе предложена и экспериментально подтверждена общая схема синтеза неионных аналогов олигонуклеотидов, позволяющая в сочетании с ВЭЖХ соотносить конфигурации при межнуклеотидных атомах фосфора в этих соединениях. Схема проверена на ди- и триэтиловых эфирах три- и тетрагетимидилатов соответственно.

На первом этапе работы были получены индивидуальные диастереомеры (Tr)Tr'(Et)T(Lev) и (Tr)Tr''(Et)T(Lev)** [1]. Дальнейшие пути их превращений показаны на схеме.

После удаления 5'-третичной защитной группы с диастереомера (Tr)Tr'(Et)T(Lev) (путь 1) и 3'-левулинильной защитной группы с диастереомера (Tr)Tr''(Et)T(Lev) (путь 2) были получены Tr'(Et)T(Lev) и (Tr)Tr''(Et)T, которые в присутствии TPS-Cl и N-метилимидазола [6] конденсировали с (Tr)Tr(ClPh) и (ClPh)pT(Lev) соответственно. В ре-

* Сообщение 1 см. [1].

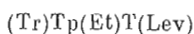
Сокращения: TPS-Cl - 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, ClPh - 4-хлорфенил, Lev - левулинил. Префикс «d» всюду опущен, так как в статье упоминаются только нуклеотиды дезоксирибы.

** r' и r'' - тетраэдрические атомы фосфора, входящие в состав исследуемых триэфирных производных и имеющие энантиомерную конфигурацию. Изомеры указанного эфира динуклеозидмонофосфата обозначены в порядке элюции при хроматографии на силикагеле (r', затем r''), т. е. в порядке убывания значения хроматографических подвижностей. Обозначение r указывает, что по данному триэфирному атому фосфора присутствует смесь энантиомеров.

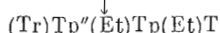
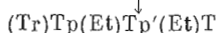
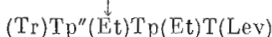
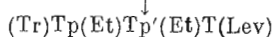
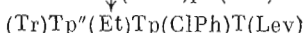
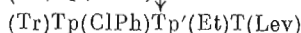
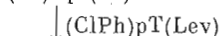
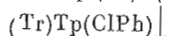
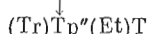
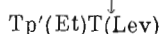
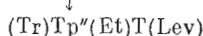
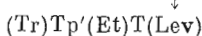
Общая схема синтеза неионных аналогов олигонуклеотидов

Путь 1

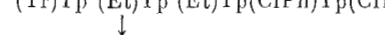
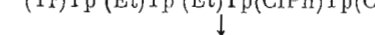
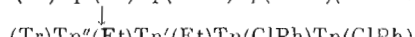
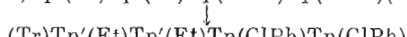
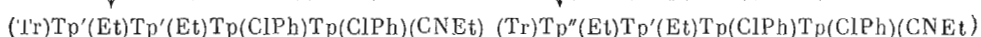
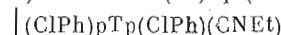
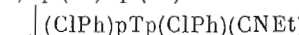
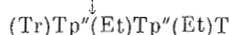
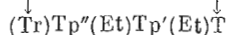
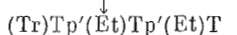
Путь 2



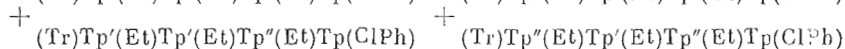
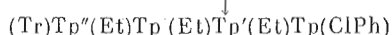
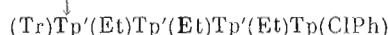
Разделение диастереомеров



Разделение диастереомеров



Разделение диастереомеров



в результате реакций образовались две пары диастереомеров — $(Tr)Tp(ClPh) \times Tp'(Et)T(Lev)$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)T(Lev)$, *n*-хлорфенильные группы которых были далее заменены на этильные реакцией переэтерификации в присутствии CsF и этанола [7]. После удаления 3'-левулинильной защитной группы диастереомеры первой пары, $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$, а также второй, $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp''(Et)T$, разделили методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке со смолой Lichrosorb 10RP18. (Эти диастереомеры можно разделить и хроматографией на силикагеле.)

Из представленной схемы синтеза видно, что один из трех получившихся диастереомеров тринуклеозиддифосфата образуется как по пути 1, так и по пути 2 (Очевидно, что это диастереомер $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$, который имеет противоположные конфигурации у двух этерифицированных атомов фосфора.) Анализ методом обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе «Милихром» подтвердил этот факт. На рис. 1а, б изображены профили хроматографического разделения отдельных пар диастереомеров $(Tr)Tp(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)T$. Из рисунков видно, что время удерживания одного из диастереомеров для каждой пары одинаково. Этот же вывод можно сделать из хроматографического разделения смеси обеих пар изомеров (рис. 1в).

На следующем этапе работы диастереомеры $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$ конденсировали в присутствии TPS-Cl и *N*-метилмидазола [6] с $(ClPh)pTp(ClPh)(CNEt)$. После удаления 2-цианэтильной защитной группы [8] получены две пары диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)Tp(ClPh)$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh) \times Tp(ClPh)$, в которых *n*-хлорфенильные группы, защищающие межнуклеотидные фосфаты, были заменены на этильные реакцией переэтерификации [7].

Каждую из двух вновь полученных пар диастереомеров разделяли методом обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе «Милихром»

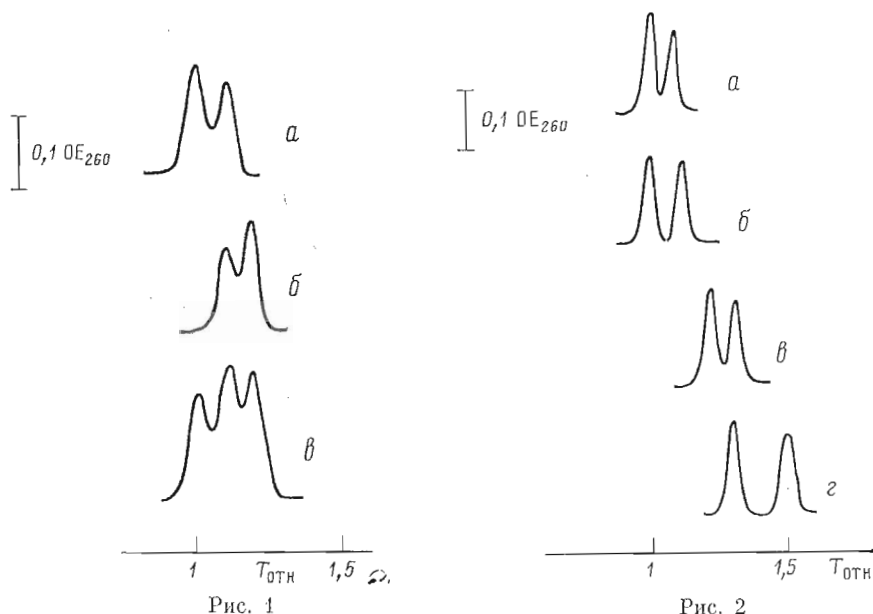


Рис. 1. Профили хроматографического разделения диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp' \cdot (Et)T(a)$, $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)T(б)$, их смеси (*в*) на колонке $(2 \times 62 \text{ мм})$ со смолой Nucleosil 5C18. Элюент — 70% CH_3OH в 0,02 М трис-АсОН (рН 7,8), скорость элюции 1,2 мл/ч, контроль по A_{260}

Рис. 2. Профили хроматографического разделения диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp' \cdot (Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$ (*а*), $(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ (*б*), $(Tr)Tp''(Et)Tp' \cdot (Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$ (*в*), $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$ (*з*) на колонке $(2 \times 62 \text{ мм})$ со смолой Lichrosorb 5RP18. Элюент — 70% CH_3OH в 0,02 М трис-АсОН (рН 7,8), скорость элюции 6 мл/ч, контроль по A_{260}

и сравнивали их времена удерживания с временами удерживания ранее синтезированных и разделенных на индивидуальные диастереомеры пар тетратимидилатов $(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ и $(Tr)Tp''(Et) \times Tp(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$ [1]. Как и следовало ожидать, при сравнении пары диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$ с парой $(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ произошло совпадение только одного из пиков (рис. 2*а, б*). Очевидно, что он соответствует диастереомеру $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$, который присутствует как в первой, так и во второй паре. Аналогично соотносили конфигурации межнуклеотидных атомов фосфора для пар диастереомеров $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et) \times Tp(Et)Tp(ClPh)$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$. Диастереомер $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$ присутствует в каждой из этих двух пар: на профиле обращенно-фазовой хроматографии видно совпадение одного из пиков (рис. 2*в, з*). Следовательно, несовпадающие пики показывают место элюции диастереомера $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$ для пары $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$, диастереомера $(Tr)Tp'(Et) \times Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ для пары $(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$, диастереомера $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ для пары $(Tr) \times Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$ и диастереомера $(Tr)Tp''(Et) \times Tp''(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)$ для пары $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et) \times Tp(ClPh)$.

Количественные данные по относительным временам удерживания индивидуальных диастереомеров три- и тетратимидилатов (таблица) свидетельствуют, что наибольшее влияние на хроматографическую подвижность оказывает конфигурация ближайшей к 5'-концу олигонуклеотида межнуклеотидной фосфатной группы, а по мере удаления межнуклеотидной этилфосфатной группы от 5'-конца молекулы это влияние ослабевает. Вероятно, этот эффект обусловлен специфическими взаимодействиями 5'-тригильной группы с ближайшими нуклеотидными звеньями. Так, ранее нам не удалось разделить диастереомеры $Tp'(Et)T$ и $Tp''(Et)T$, не содержащие 5'-тригильную группу [1].

Относительные времена удерживания диастереомеров этиловых эфиров три- и тетрагидримидилатов *

Диастереомер **	$T_{отн}$
1. (Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)	1,00
2. (Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)	1,08
3. (Tr)Tp'(Et)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)	1,13
4. (Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)	1,20
5. (Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)	1,29
6. (Tr)Tp''(Et)Tp''(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh)	1,49
7. (Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)T	1,00
8. (Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T	1,12
9. (Tr)Tp''(Et)Tp''(Et)T	1,20

* $T_{отн} = T_i/T_1$ (для 1—6) и $T_{отн} = T_i/T_7$ (для 7—9), где T_i — время удерживания i -го пика.

** Хроматография выполнена на колонке со смолой Lichrosorb 5RP18 (для 1—6) и Nucleosil 5C18 (для 7—9).

Методология, примененная в настоящей работе, может быть использована для синтеза любого диастереомера с определенным соотношением конфигураций у всех этерифицированных межнуклеотидных атомов фосфора. Если же известна абсолютная конфигурация хотя бы при одном из межнуклеотидных атомов фосфора, становится очевидной абсолютная конфигурация и у всех остальных атомов фосфора молекулы. Схемы получения диастереомеров этиловых эфиров гомогенных ди-, три- и тетрадезоксинуклеотидов изложены в настоящей и предыдущей работе [1]. Синтезы более длинных производных олигонуклеотидов можно осуществлять по аналогичным схемам, используя в качестве строительных единиц ди-, три- и тетрамерные блоки с известным соотношением конфигураций при межнуклеотидных атомах фосфора.

Экспериментальная часть

В работе использовали (Tr)T, TPS-Cl, (ClPh)pT(Lev) — препараты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР, абсолютные пиридин, 1,4-диоксан, хлороформ, этанол, ацетонитрил, триэтиламин, N-метилимидазол (Fluka, Швейцария).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах хлороформ — этилацетат — метанол (3 : 6 : 1) и хлороформ — метанол (9 : 1).

Обращенно-фазовую хроматографию на хроматографах «Милихром» (г. Орел, СССР) и Altex (Altex, США) проводили согласно работе [9] в буфере метанол — 0,066 М трис-АсОН, 7 : 3, pH 7,8. Колонка (2×62 мм) со смолой Nucleosil 5C18 (Macherey-Nagel, ФРГ) и со смолой Lichrosorb 5RP18 (Merck, ФРГ); колонка (4,6×250 мм) со смолой Lichrosorb 10RP18. Фосфорилирующий реагент получали по методу [1].

(Tr)Tp(ClPh). 0,5 ммоль (Tr)T обрабатывали 30 мин 5 мл фосфорилирующей смеси. Затем добавляли 5 ммоль 2-цианэтанола и хроматографировали на колонке (2,5×20 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол (97 : 3). Получили 0,45 ммоль (Tr)Tp(ClPh)(CNEt). 2-Цианэтильную группу удаляли обработкой смесью ацетонитрил — триэтиламин (1 : 1) в течение 1 ч [8], упаривали несколько раз с абсолютным хлороформом и использовали в реакции конденсации с Tp'(Et)T(Lev).

(ClPh)pTp(ClPh)(CNEt). 0,4 ммоль (Tr)Tp(ClPh)(CNEt) обрабатывали 15 мин 5 мл 80% уксусной кислоты при кипении, упаривали, растворяли в хлороформе и хроматографировали на колонке (2,5×20 см) с силикагелем (линейный градиент концентрации метанола от 0 до 10% в хлороформе, общий объем градиента 800 мл). Получили 0,34 ммоль Tp(ClPh)×(CNEt), которые растворяли в 3 мл абс. пиридина, добавляли 3,4 мл фосфорилирующего реагента и выдерживали 30 мин. К смеси добавляли 3,4 мл H₂O, упаривали и хроматографировали на колонке (2×35 см) с силикагелем (линейный градиент концентрации метанола от 0 до 40% в хлороформе, общий объем градиента 400 мл). Фракции, содержащие (ClPh)×

$\times pTp(ClPh)(CNET)$, объединяли и упаривали. Получили 0,29 ммоль $(ClPh)pTp(ClPh)(CNEt)$.

$(Tr)Tp'(Et)T(Lev)$ и $(Tr)Tp''(Et)T(Lev)$ получали конденсацией $(Tr)T$ и $(ClPh)pT(Lev)$ по методу [6] с последующей переэтерификацией [7] и разделением диастереомеров [1].

$Tp'(Et)T(Lev)$ получали из $(Tr)Tp'(Et)T(Lev)$ после удаления три-тильной защитной группы и последующей хроматографии (см. выше).

$(Tr)Tp''(Et)T$. Левулинильную защитную группу с $(Tr)Tp''(Et)T(Lev)$ удаляли обработкой смесью метанол — 25% водный аммиак (1:1) в течение 3 ч при 25° С и хроматографировали на колонке (2×17 см) с силикагелем. Элюент — метанол — хлороформ (1:9).

$(Tr)Tp(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)T$. $Tp'(Et)T(Lev)$ и $(Tr)Tp''(Et)T$ конденсировали с $(Tr)Tp(ClPh)$ и $(ClPh)pT(Lev)$ соответственно по методу [6] с последующей переэтерификацией [7] и удалением левулинильной защитной группы (см. выше). Пары диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$, $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp''(Et)T$ разделяли на колонке (4,6×250 мм) с обращенной фазой Lichrosorb 10RP18 в буфере метанол — 0,066 М трис-АсОН (7:3), рН 7,8, на хроматографе Altex.

$(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(Et)\times Tp(ClPh)$. $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)T$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)T$ конденсировали с $(ClPh)pTp(ClPh)(CNET)$ по методу [6] с дальнейшим удалением 2-цианэтильной защитной группы [8] и последующей переэтерификацией [7]. Пары диастереомеров $(Tr)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ и $(Tr)\times Tp'(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$, $(Tr)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ и $(Tr)Tp''(Et)Tp''(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh)$ разделяли на колонке (2×62 мм) с обращенной фазой Lichrosorb 5RP18 в буфере метанол — 0,066 М трис-АсОН (7:3), рН 7,8, на хроматографе «Миличром».

Авторы выражают благодарность Г. И. Бараму (НИОХ СО АН СССР) за предоставление высокоэффективной колонки (2×62 мм) с обращенной фазой и Грачеву М. А. (НИОХ СО АН СССР) за постоянный интерес и поддержку при выполнении настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамова Т. В., Лебедев А. В.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 824—831.
2. *Pless R. C., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 6, p. 1239—1250.
3. *Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. B.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 9659—9665.
4. *Карпова Г. Г., Козлова Л. О., Пичко Н. П.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1983, № 7, вып. 3, с. 96—100.
5. *Chacko K. K., Linder K., Saender W., Miller P. S.* Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 9, p. 2801—2813.
6. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ромащенко В. П.* Биоорган. химия, 1982, т. 9, № 14, с. 516—521.
7. *Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431—435.
8. *Drechworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Hong G. E., Sing M., Titmas P. C.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691—1706.
9. *Baran J. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelvoyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A.* J. Chromatogr., 1983, v. 264, № 1, p. 69—90.

Поступила в редакцию 3.II.1984

INVESTIGATION OF DIASTEREOMERS OF NON-IONIC OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES. II. CORRELATION OF CONFIGURATION AT PHOSPHORUS ATOMS IN DIASTEREOMERIC OLIGOTHYMYDYLATE ETHYL PHOSPHOTRIESTERS

ABRAMOVA T. V., KOMAROVA N. I., LEBEDEV A. V., TAGAY S. A.

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

A scheme for synthesis of oligothymidylate ethyl phosphotriesters that allows, in combination with HPLC, to correlate configurations at different internucleotide triester phosphorus atoms has been proposed and experimentally verified. The scheme has been applied to the synthesis of tri- and tetrathymidylate ethyl phosphotriesters $(Tr)Tp(Et)-Tp(Et)T$ and $(Tr)Tp(Et)Tp(Et)Tp(Et)Tp(ClPh)$. Configuration of all internucleotide ethylphosphate fragments in individual diastereomers of the above compounds has been determined relatively to earlier synthesized $Tp'(Et)T$ and $Tp''(Et)T$ diastereomers.