



УДК 577.143.4/5

## ТИОФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

## IV\*. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ЦВИТТЕР-ИОННЫХ МОНОМЕРОВ ДЛЯ СИНТЕЗА 5'-ФОСФОТИОЭФИРНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Богачев В. С., Кумарев В. П.

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

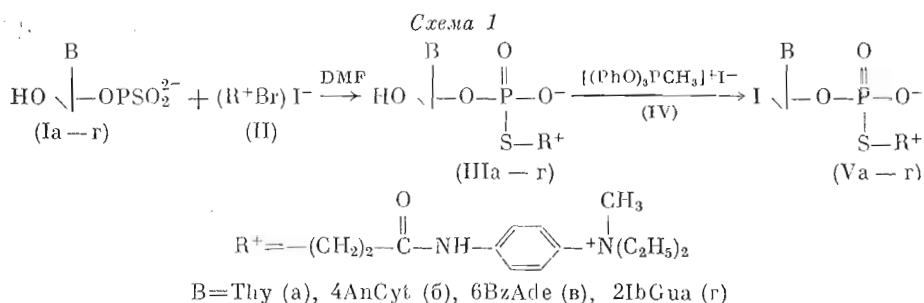
Синтезированы новые высокоэффективные мономеры для синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов — N-защищенные 2', 5'-дидезокси-5'-поднуклеозид-3'-O-[S-β-[N-(*n*-диэтилметиламино)фенил]карбамоилэтил] тиофосфаты, являющиеся цвиттер-ионными соединениями, алкилированием N-защищенных дезоксирибонуклеозид-3'-O-тиофосфатов 2-бром-[N-(*n*-диэтилметиламино)фенил]пропонамидом в DMF с последующим подирированием образующегося продукта подиридом трифеноксиметилфосфония в том же растворителе. Изучена кинетика реакций полученных мономеров с Li<sup>+</sup>- и Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-солями тимидин-3'-O тиофосфата в DMF. Найдено, что в первом случае она подчиняется уравнению первого, а во втором случае — второго порядка. Иодометрическим методом определены константы скорости изученных реакций. Показано, что реакционная способность синтезированных мономеров в указанных реакциях соответственно в 3–5 и 40 раз выше, чем у аналогичных отрицательно заряженных соединений.

Ранее нами был разработан общий метод синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих неприродные P-S-C(5')-межнуклеотидные связи [2, 3], ключевой стадией которого является реакция алкилирования 2'-дезоксинуклеозид-3'-O-тиофосфатов специальными нуклеотидными мономерами — 2',5'-дидезокси-5'-поднуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил) тиофосфатами в DMF [4, 5]. Но применение этого метода показало, что ему присущи серьезные недостатки. В частности, следует признать неудачным выбор структуры мономеров; наличие у них отрицательного заряда вызывает нежелательные электростатические взаимодействия с полианионами олигомерных P<sub>s</sub>-компонентов, увеличение длины последних резко уменьшает скорость реакции алкилирования [3]. Это приводит к неоправданно большим затратам времени при синтезе 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигонуклеотидов большой длины, тем самым ограничивая сферу применения указанного метода. Таким образом, поиск более эффективных мономеров для синтеза указанных аналогов стал весьма актуальной задачей. Из полученных нами ранее данных [4] следовало, что реальным путем решения этой проблемы является варьирование заряда интересующих нас соединений. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе таких мономеров в форме цвиттер-ионов и о результатах исследования их реакционной способности в реакциях алкилирования 2'-дезоксинуклеозид-3'-O-тиофосфатов в DMF.

При выборе структуры и схемы синтеза целевых мономеров мы учитывали кроме главной цели — достижения их электронейтральности — также легкость осуществления синтеза. Исходя из этих соображений, за основу структуры мономеров мы взяли известные аналогичные соединения: 2',5'-дидезокси-5'-поднуклеозид - 3'-O-[S-β-(N,N-дифенил)карбамоилэтил] тиофосфаты, способ получения которых был разработан нами ранее [4]. Для нейтрализации отрицательного заряда тиофосфатной группы в состав защитной карбамоилэтильной группировки таких соединений вводили по-

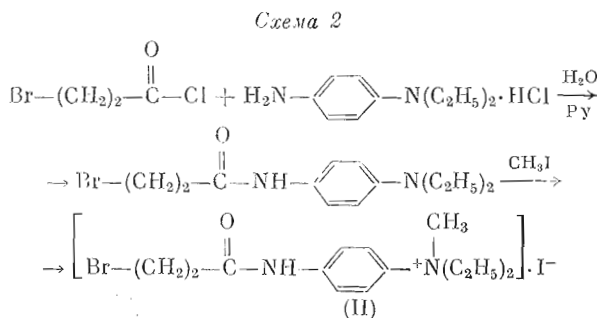
\* Сообщение III см. [1]. Используются следующие нестандартные сокращения: P<sub>s</sub> — тиофосфат, Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> — катионы тетра-*n*-бутиламмония, DMF — N,N-диметилформамид.

ложительно заряженную четвертичную аммониевую группу. Структура и схема синтеза мономеров (Va-r) представлены на схеме 1:



Для реализации данной схемы требовалось получить положительно заряженное производное 2-бромпропаноамида (II), подобрать условия реакции алкилирования таким соединением 2'-дезоксинуклеозид-3'-О-тиофосфатов [5] и последующего иодирования внутренних солей производных (IIIa-r) подщом трифеноксиметилфосфония (IV).

Бромалкил (II) был получен по схеме 2, исходя из хлоргидрата *n*-N,N-диэтилфенилендиамин (цветное проявляющее вещество):



Реакцию ацилирования проводили в воде, используя эквивалентные соотношения реагентов и пиридин для связывания выделяющегося HCl. После нейтрализации реакционной смеси содой промежуточный амид, выпадающий при этом в осадок, метилировали далее избытком CH<sub>3</sub>I, получая после кристаллизации из этанола бромалкил (II) с выходом 68%. Гомогенность и структуру синтезированного продукта подтверждали данными ТСХ, УФ- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии (табл. 1, 2).

Исследование алкилирующих свойств бромалкила (II) в реакции с Li<sup>+</sup>-солью тиофосфата (Ia) в 90% водном DMF показало, что он является

Таблица 1

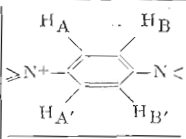
Характеристика синтезированных соединений

Соединение	R <sub>f</sub> в системах			λ <sub>макс</sub> , нм (ε)	λ <sub>мин</sub> , нм (ε)	Отношение вещество — тиофосфат — иод *, моль/моль
	A	B	B			
(Va)	0,25	0,43	0,40	253(20400)	227(9400)	1 : 0,97 : 0,97
(Vб)	0,31	0,46	0,39	252(24500)	234(18500)	1 : 0,98 : 0,98
				303(22400)	274(17500)	
(Vв)	0,24	0,36	0,36	252(24000)	225(18300)	1 : 0,96 : 0,96
				280(18960)	272(17500)	
(Vr)	0,23	0,39	0,30	255(28600)	226(10800)	1, : 0,97 : 0,97
(VIa)	0,71	0,86	0,78	267(9600)	235(2600)	1 : 0,98 : 0,98
(Ia)	0,23	0,61	0,52	267(9600)	236(2500)	1 : 0,99
(IIIa)	0,25	0,42	0,39	253(20400)	227(9400)	
(II)	0,24	0,32	0,44	249(14100) **	218(2400) **	

\* Определялось реакцией образования соответствующего циклотиофосфата (см. «Экспер. часть»).

\*\* Данные для хлорида соединения (II).

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах синтезированных соединений \*

Соединение	2-Н или 5-Н	6-Н или 8-Н	1'-Н	2',2''-Н	$\text{CH}_2$ - $(\text{CH}_2\text{N}^+)$	$\text{CH}_2$ - $\text{N}^+$			Остальные сигналы
							$\text{H}_A$	$\text{H}_B$	
(II)					4,15	3,48	7,70	7,78	$\text{CH}_2\text{Br}$ 3,51; $\text{CH}_2(\text{CO})$ 3,16; $\text{CH}_2(\text{N}^+)$ 3,83 и 4,02
(Va)		7,52	6,23	2,47	1,06	3,42	7,69	7,83	$5\text{CH}_3$ 1,83; 4'-Н 4,04; 3'-Н 4,73
(Vб)	7,43	8,20	6,55	2,36 2,79	1,09	3,42	7,61	7,76	3'-Н 4,79; $\text{N}^4\text{An}$ 3,90; 7,09 и 7,92
(Vв)	8,55	8,75	6,58	$\sim 2,82$ $\sim 3,13$	1,06	3,39	7,73	7,56	3'-Н 5,08; 4'-Н 4,12; $\text{N}^6\text{Bz}$ 7,47-8,07
(Vг)		8,15	6,37	$\sim 2,80$ $\sim 3,11$	1,10	3,43	7,68	7,56	3'-Н 5,06; 4'-Н 4,2; $\text{N}^2\text{Ib}$ 1,22 и 2,74

\* Приведены значения химического сдвига центра сигнала или наиболее интенсивного пика, а также вычисленные значения.

очень реакционноспособным соединением (рис. 1). Так, константа скорости первого порядка данной реакции ( $k_1=2,5 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ,  $\tau_{1/2}=30 \text{ с}$ ) более чем в 17 раз превышает константу скорости реакции незаряженного прототипа соединения (II) — 2-бром-(N, N-дифенил)пропионамида в тех же условиях ( $k_1=1,4 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $\tau_{1/2}=507 \text{ с}$ ). Реакция в первом случае заканчивается менее чем за 3 мин, при этом единственным продуктом является соединение (IIIa). Ввиду сходности строения двух изученных бромалкильных соединений большую реакционную способность соединения (II) логично объяснить наличием у него положительного заряда. Взаимодействие такого производного с тиофосфатом (Ia) в DMF включает, по-видимому, стадию образования ионной пары  $(\text{Ia})^{2-} \cdot (\text{II})^+$ , в пределах которой реакция протекает как мономолекулярный процесс, что и может быть причиной ее ускорения. Влияние заряда бромалкила (II) на скорость его реакции с тиофосфатом (Ia) в DMF свидетельствует о наличии сильных электростатических взаимодействий в применяемых условиях и подтверждает правильность выбранного нами пути новышения реакционной способности интересующих нас мономеров. Идентификация продукта алкилирования (IIIa) была проведена на основании хроматографических, УФ-спектральных и подинетрических [5] данных (табл. 1). При ионообмен-



Рис. 1. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых расходования тиофосфата (Ia) при взаимодействии его  $\text{Li}_2$ -соли (0,05 M) с 0,1 M 2-бром-(N, N-дифенил)пропионамида (I) или 0,1 M бромалкила (II) (2) в 90% водном DMF, 2%  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8, 22° C

Условия синтеза мономеров (Va—г)

Соединение	1-я стадия				2-я стадия			
	Li <sub>2</sub> -соль (Ia—г)	(II)	DMF, мл	Время, мин	(IV), ммоль	DMF, мл	Время, мин	Выход, %
	ммоль							
(Va)	1,0	4,2	2	2	4,2	2	15	80
(Vб)	1,5	4,8	3	2	4,8	2	15	82
(Vв)	1,5	4,8	3	2	4,8	3	20	76
(Vг)	1,1	4,3	3	2	4,3	3	20	79

ной хроматографии внутренняя соль (IIIa) не сорбируется ни катионо-, ни анионообменными смолами, она не восстанавливает I<sub>2</sub>, но после обработки 1 M LiOH в течение 30 мин при 22° C образует тиофосфат (Ia) с количественным выходом в результате отщепления R<sup>+</sup>-группы ( $k_1 = 2,1 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $\tau_{1/2} = 5,5 \text{ мин}$ ). Для preparativного приготовления соединений (IIIa—г) (табл. 3) использовали 20% избыток бромалкила (II), при этом реакция заканчивалась в течение 2 мин, о чем свидетельствовали данные ТСХ и иодометрии. Выход продуктов (IIIa—г), определенный этими методами, был близок к количественному, поэтому их без очистки использовали на следующей стадии в реакции иодирования.

Замещение 5'-ОН-группы в соединениях (IIIa—г) на атом иода проводили методом Верхейдена — Моффата [6], разработанным ими для иодирования нуклеозидов, с использованием очень активного агента — трифеноксиметилфосфонийиодида (IV) в DMF. Ранее нами было показано, что данный метод применим и для иодирования производных нуклеотидов [4]; при этом не отмечалось побочной реакции расщепления фосфоди- и фосфотиоэфирных связей (ср. [7]). Реакцию иодирования осуществляли по схеме 1, используя условия, приведенные в табл. 3. Избыток иодида (IV) разлагали метанолом и продукт реакции осаждали смесью ацетон — эфир. Ввиду высокой лабильности иодида (IV) в водном DMF при проведении реакции иодирования особое внимание уделяли высушиванию реагентов и растворителя. Для этого реакционные смеси, полученные после проведения реакции алкилирования, упаривали в мягких условиях с пиридином. При этом вместе с водой происходило и удаление DMF, а следы пиридина, оставшиеся в реакционной смеси после высушивания, служили для нейтрализации HI, образующейся при разложении иодида (IV) следами влаги, что предотвращало апуринизацию реакционного продукта. Выделение мономеров (Va—г) осуществляли в два этапа. Заряженные примеси сорбировали, пропуская растворы соединений (Va—г) через колонку, содержащую смесь анионо- и катионообменных смол. Далее их очищали при помощи гель-хроматографии на колонках с сефадексом G-15, при этом отделялись менее гидрофобные, чем продукт, примеси, появляющиеся, вероятно, в результате разложения иодида (IV) (рис. 2).

Мономеры (Va—г) были выделены в виде бесцветных порошков после осаждения из метанола в эфир с выходом 76—82%. Они были гомогенны при ТСХ, УФ-спектры в воде близки к расчетным, полученным суммированием спектров соединений (Ia—г) и (II) (табл. 1). Данные <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии также подтверждают их структуру (табл. 2). Отнесение сигналов в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах мономеров (Va—г) было проведено на основании сопоставления их со спектрами алкилбромидов (II) и 2',5'-дидезокси-5'-идотимидина [6], а также со спектрами нуклеотидов [8]. Способность соединений (Va—г) после удаления R<sup>+</sup>-группы образовывать с высоким выходом 2',5'-дидезокси-5'-меркаптонуклеозид-3',5'-циклотиофосфаты (VIIIa—г, см. схему 3) в разбавленных растворах DMF (по данным ТСХ, иодометрии и УФ-спектроскопии [5]) свидетельствует о наличии в их структуре атомов иода и P<sub>S</sub>-групп (табл. 1).

Благодаря очень высокой реакционной способности алкилбромидов (II) соединения (Va—г) могут быть получены из известных мономеров для

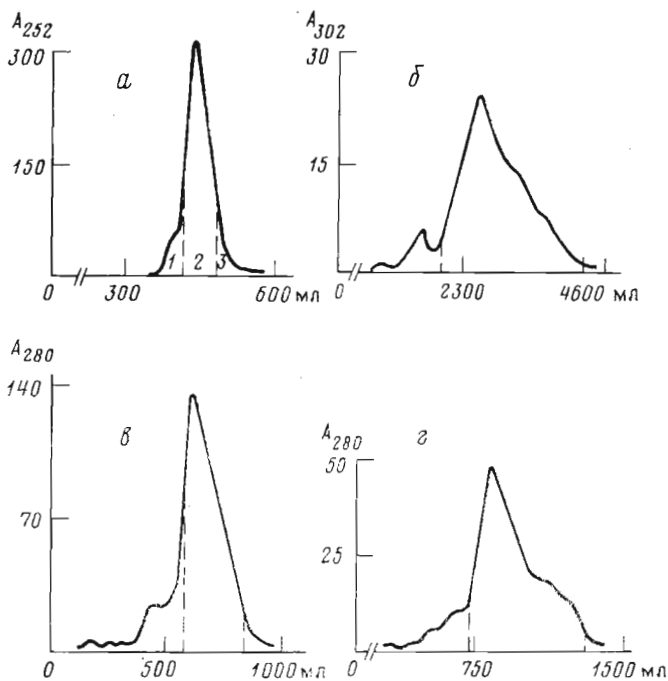
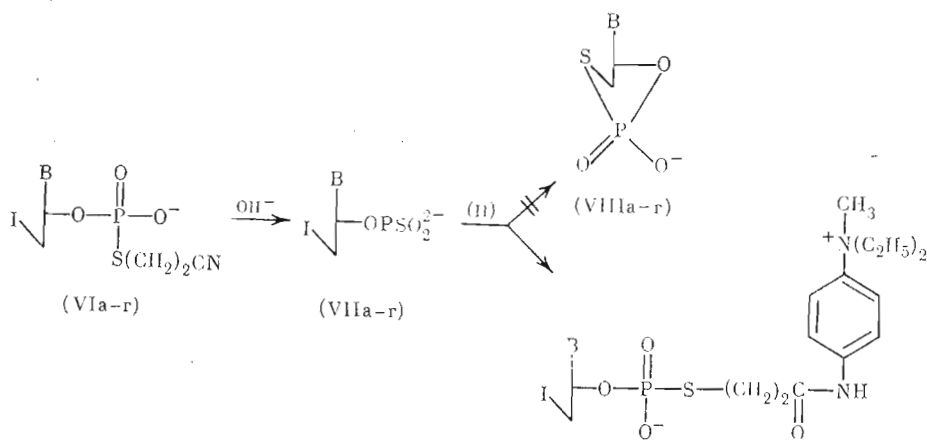


Рис. 2. Выделение мономеров (Va-г) гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15 при 5° С (указаны соединение, размеры колонки (см), элюент, скорость элюции (мл/ч), количество выделенного продукта): а - (Va), 2,5×122, вода, 50, 12200 OE<sub>267</sub>; б - (Vб), 4,5×75, 15% водный спирт, 120, 33000 OE<sub>302</sub>; в - (Vв), 2,5×122, 10% водный спирт, 40, 24340 OE<sub>280</sub>; г - (Vг), 4,5×75, 10% водный спирт, 78, 11100 OE<sub>280</sub>

синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигонуклеотидов - 2',5'-дидезокси-5'-поднуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфатов (VIa-г) путем замены защитных группировок на тиофосфатной группе. Возможность такого подхода была продемонстрирована нами на примере синтеза мономера (Va) (схема 3):

Схема 3



B=Thy(a), 4AnCyt(б), 6BzAde(в), 2IbGua(г) (Va-г)

После деблокирования P<sub>S</sub>-группы в мономере (VIa) щелочью образовавшийся тиофосфат (VIIa) обрабатывали 5-кратным избытком алкила (II) в 60% водном DMF. Ход реакции контролировали иодометрическим методом и ТСХ. Реакция заканчивается через 25 мин, при этом практиче-

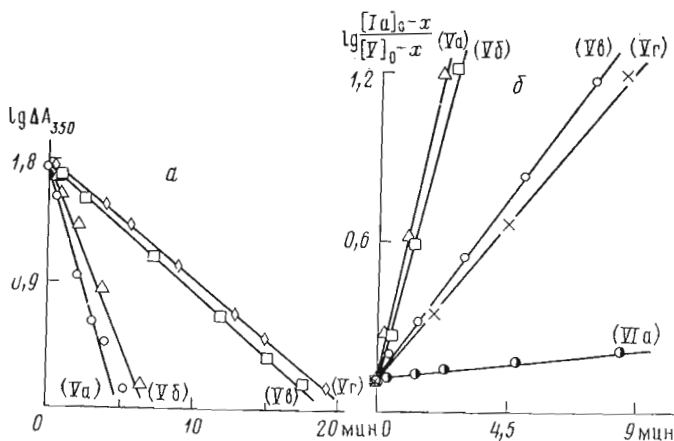


Рис. 3. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых расщепления тиофосфата (Ia) в реакциях его алкилирования соединениями (Va-γ) в DMF при 22° С (указаны реагенты и их концентрации): а — 0,025 М Li<sub>2</sub><sup>+</sup>-соль (Ia) и 0,05 М (Va-γ); б — 0,019 М (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)<sub>2</sub>-соль (Ia) и 0,025 М (Va-γ) или (VIa)

ски не наблюдается образования циклотиофосфата (VIIIa) — продукта внутримолекулярной циклизации соединения (VIa). Мономер (Va) был выделен ионообменной хроматографией с выходом 75%; он был гомогенен по данным ТСХ, имея ту же подвижность при ТСХ, что и контрольный образец (Va). Осуществление данного синтеза — редкий пример преобладания бимолекулярной реакции над мономолекулярной, открывающий благоприятные перспективы для применения блочного метода синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигонуклеотидов. Например, динуклеотидные блоки можно получить по схеме 3, заменив соединение (II) положительно заряженным мономером, аналогичным мономерам (Va-γ).

Далее мы предприняли исследование алкилирующей активности синтезированных мономеров (Va-γ). С этой целью была изучена кинетика их реакции с Li<sup>+</sup>- и Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-солями тиофосфата (Ia) в DMF при 22° С. Кинетические измерения выполняли методом отбора проб, определяя концентрацию тиофосфатных групп в них иодометрическим методом [5]. Из полученных данных следует, что кинетика реакции в первом случае следует уравнению первого порядка, а во втором — уравнению второго порядка, о чем свидетельствует линейность полулогарифмических анаморфоз кинетических кривых реакций в соответствующих координатах (рис. 3). Первый порядок характерен для реакций алкилирования Li<sup>+</sup>- или Na<sup>+</sup>-солей тиофосфата (Ia) алкилгалогенидами в DMF в области умеренных концентраций реагентов (0,01–0,1 М) [1, 3, 5]. Этот эффект может быть объяснен неполной диссоциацией названных солей тиофосфата (Ia) в применяемых условиях [1]. Константы скорости реакций мономеров (Va-γ) с Li<sup>+</sup>-солью тиофосфата (Ia) в 3–5 раз, а с Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-солью в 40 раз выше, чем константы скорости соответствующих реакций отрицательно заряженных мономеров (VIa-γ) [5] (табл. 4). Сравнительно небольшое различие констант скорости в первом случае можно объяснить образованием ионных пар анионов соединений (VIa-γ) с катионами лития, что приближает реакционную способность таких мономеров к дитер-новым производным (Va-γ). При использовании Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-солей реагентов ионные пары практически не образуются [1], поэтому различие констант скорости изученных реакций становится значительно большим вследствие уменьшения сил электростатического отталкивания реагирующих частиц в активированном комплексе. Из табл. 4 следует, что пуриновые производные (Vb, γ) в 3–4 раза менее реакционноспособны, чем пиримидиновые производные (Va, б). Такое же соотношение наблюдалось и для отрицательно заряженных мономеров (VIa-γ) [5]. Оно связано, вероятно, с различиями в конформации этих соединений, что может при-

Зависимость констант скорости первого и второго порядка реакций алкилирования тиофосфата (Ia) различными мономерами в DMF при 22° С от строения последних

Константа скорости	Мономер							
	(Va)	(Vб)	(Vв)	(Vг)	(VIa)	(VIб)	(VIв)	(VIг)
$k_1 \cdot 10^3, \text{с}^{-1} *$	7,5	5,8	2,0	1,9	2,1 **	1,8 **	0,5 **	0,4 **
$k_2 \cdot 10^2, \text{с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1} ***$	34,6	28,3	9,7	8,2	0,86			

\*  $[\text{Li}_2\text{-соль (Ia)}]_0 = 0,05 \text{ М}$ ,  $[\text{мономер}]_0 = 0,1 \text{ М}$ .

\*\* Данные из работы [5], исправленные делением на отношение  $[\text{мономер}]_0 / [(\text{Ia})]_0 = 2$ .

\*\*\*  $[(\text{Bu}_4\text{N}^+)_2\text{-соль (Ia)}]_0 = 0,019 \text{ М}$ ,  $[\text{мономер}]_0 = 0,025 \text{ М}$ .

водить к различиям в доступности 5'-атома углерода для нуклеофильной атаки  $\text{P}_5$ -группы. В применяемых условиях реакция  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ -соли тиофосфата (Ia) с пиримидиновыми мономерами (Va, б) заканчивается за 2–3 мин, а с пуриновыми (Vв, г) — за 8–10 мин.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что новые цвиттер-ионные мономеры (Va–г) являются гораздо более реакционноспособными соединениями в реакциях алкилирования производных тиофосфата, чем известные отрицательно заряженные аналогичные мономеры (VIa–г). Наибольший эффект при использовании таких мономеров достигается в реакции с наиболее реакционноспособными [1] и хорошо растворимыми в DMF  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ -солями  $\text{P}_5$ -производных. Это открывает благоприятные перспективы для применения новых мономеров для синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов нуклеиновых кислот. Более того, варьирование электростатических характеристик реагентов является, на наш взгляд, одним из наиболее эффективных способов увеличения скорости и других ионных реакций в неводных растворителях средней и низкой полярности, например при синтезе олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-дезоксинуклеозиды и  $\text{PSCl}_3$  (Merck, ФРГ), сефадекс G-15 (Pharmacia, Швеция), ионообменные смолы дауэкс 50W×2 и дауэкс 1×2 (Dow-Chemical, США), хлоридрат *n*-N,N-диэтилфенилендиамина (Союзреактив). Соединения (Ia–г) синтезировали методом, описанным в работе [5], соединение (VIa) и 2-бром-(N,N-дифенил)пропионамид — по методике, приведенной в [4], иодид (IV) — по работе [6], хлорангидрид 2-бромпропионовой кислоты — по работе [9].

ТСХ проводили на пластинках силифола (Kavalier, ЧССР) в системах: хлороформ — метанол — 1 М ацетат натрия (рН 6,5), 10 : 20 : 5 (А); бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5 (Б); изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 0,5 : 2,5 (В). Продукты на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете (ультрахеомископ Брумберга) и проявлением реактивом Дипе,  $\text{P}_5$ -производные — обработкой парами иода. Запись УФ-спектров и измерение поглощения проводили на регистрирующем спектрофотометре Sre-cord (ГДР),  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры записывали на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ) на частоте 200,13 МГц в  $\text{D}_2\text{O}$  при 70° С, используя в качестве внутреннего стандарта  $\text{Me}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$  (химический сдвиг относительно  $\text{Me}_3\text{Si} - 0,015$ ). Высушивание веществ проводили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  при 20° С в течение 10–12 ч. Абсолютные растворители готовили по методикам [10], DMF и пиридин хранили в темноте над молекулярными ситами 4 Å.

2-Бром[*N*-(*n* - диэтилметиламино)фенил]пропионамид иодид (II). К раствору в воде 8 г (40 ммоль) хлоргидрата *n*-N,N-диэтилфенилендиамина (перекристаллизован из этанола с активированным углем) прибавляли 2,8 мл (40 ммоль) пиридина и по каплям, при перемешивании, добавляли 9,2 г (40 ммоль) хлорангидрида 2-бромпропионовой кислоты (све-

жеперегнан в вакууме, т. кип. 52° С, 12 мм рт. ст.). Смесь перемешивали 0,5 ч до растворения капель хлорангидрида, добавляли бикарбонат натрия до pH 9 и объемистый осадок отфильтровывали, промывали водой (3×20 мл) и высушивали. Полученный продукт (11,2 г,  $R_f$  0,52 (эфир)) растворяли в смеси этанол — ацетонитрил — бензол, 5 : 4 : 1 (100 мл) и обрабатывали 142 г (1 моль)  $\text{CH}_3\text{I}$  в течение 14 ч. ТСХ на силуфол в эфире показывает исчезновение продукта с  $R_f$  0,52 и появление нового вещества с  $R_f$  0. Реакционную смесь упаривали, остаток кристаллизовали из спирта — ацетона в присутствии следов меркаптоэтанола. Выход соединения (II) составил 12 г (68%), т. пл. 204—206° С.

*Синтез соединений (Va—г)* осуществляли по типовой методике, подробно описанной ниже для случая соединения (Va). Условия проведения синтеза других производных (Vб—г) см. в табл. 3, условия их выделения — на рис. 2, хроматографические и спектральные характеристики — в табл. 1, 2, исследование их алкилирующих свойств — на рис. 3.

*2',5'-Дидезокси-5'-идоглимидин-3'-О-{S-β-[N-(n-диэтилметиламино)фенил]карбамоилэтил}тиофосфат (Va)*. К раствору 0,386 г (1 ммоль) дигидрата дилитиевой соли тиофосфата (Ia) в 2 мл DMF прибавляли 0,53 г (1,2 ммоль) соединения (II), встряхивали до растворения. Раствор выдерживали 2 мин, добавляли 10 мл пиридина и смесь упаривали в вакууме. Эту процедуру повторяли дважды, добавляли 5 мл толуола и также упаривали. Остаток растворяли в 2 мл DMF, к раствору прибавляли 0,53 г (1,2 ммоль) подида (IV) и выдерживали 15 мин. К раствору добавляли 1 мл метанола и продукт осаждали смесью ацетон — эфир, 2 : 1 (50 мл). Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (3×10 мл) и высушивали. Бесцветный порошок растворяли в 5 мл 50% водного спирта и наносили на колонку, содержащую в верхней части дауэкс 1 ( $\text{HCO}_3^-$ ) (5 мл), а в нижней — дауэкс 50 ( $\text{NH}_4^+$ ) (5 мл). Продукт элюировали 50% водным спиртом, элюат упаривали в вакууме до объема 2 мл и наносили на колонку с сефадексом G-15 (fine) (рис. 2a). Фракции, соответствующие центральной (2) и боковым (1, 3) частям пика продукта, объединили отдельно, получив соответственно 11 000 ОЕ<sub>267</sub> (1-я порция) и 1800 ОЕ<sub>267</sub> (2-я порция). После упаривания растворителя и осаждения продукта из 2 мл метанола в 100 мл эфира получили соответственно 0,49 г (72%) и 0,08 г соединения (Va). После рехроматографии второй порции на той же колонке в тех же условиях выделили еще 0,053 г (7,8%) чистого продукта. Общий выход соединения (Va) составил 80%.

*Синтез соединения (Va) из соединения (VIa)*. Раствор 0,1 г (0,2 ммоль) соединения (VIa) в воде (1,25 мл) обрабатывали 1,25 мл 2 н. LiOH и выдерживали 10 мин в вакууме. Реакционную смесь нейтрализовали дауэксом 50 ( $\text{H}^+$ ) до pH 7,5 и добавляли раствор 0,44 г (1 ммоль) соединения (II) в 4 мл DMF. Через 25 мин ТСХ показывает исчезновение тиофосфата (VIa) ( $R_f$  0,60 (Б)) и появление вещества с  $R_f$  0,42, совпадающего с контрольным образцом мономера (Va). При этом наблюдается исчезновение  $\text{P}_S$ -групп по данным иодометрии. Через 25 мин смолу отфильтровывали и продукт выделяли аналогично соединению (Va). Выход полученного таким способом мономера (Va) составил 0,1 г (75%).

*Кинетика взаимодействия мономеров (Va—г) с  $\text{Li}^+$ - и  $\text{Bu}_3\text{N}^+$ -солями тиофосфата (Ia) в DMF*. Кинетические измерения проводили методом отбора проб [4], определяя концентрацию  $\text{P}_S$ -групп в пробах иодометрическим методом [1, 5]. Расчет констант скорости первого и второго порядка выполняли путем определения тангенса угла наклона полулогарифмических аваморфоз кинетических кривых реакций в координатах соответственно  $\lg([V]_0 - x) - t$  и  $\lg([Ia]_0 - x/[V]_0 - x) - t$ , где  $[V]_0$  — начальная концентрация соединений (Va—г), моль/л;  $[Ia]_0$  — начальная концентрация тиофосфата (Ia), моль/л;  $x$  — концентрация продукта реакции. Концентрацию соединений (Va—г) рассчитывали по формуле  $[V] = [Ia] \cdot a_0$ , где  $a_0 = [V]_0/[Ia]_0$ .

*Реакция циклизации мономеров (Va—г)*. Раствор соединений (Va—г) в 0,04 мл 40% гидроокиси тетраэтиламмония в 50% водном метаноле выдерживали 15 мин, нейтрализовали дауэксом 50 ( $\text{H}^+$ ) до pH 8. Смолу от-



фильтровывали, фильтрат упаривали досуха и полученное масло растворяли в 0,4 мл DMF. Через 5 мин раствор наносили на пластинку силифола размером 10×10 см и проводили ТСХ в системе А. Циклотиофосфаты (VIIa–г) элюировали водой и определяли их концентрацию спектрофотометрически при 260 нм, используя в качестве контроля элюат соответствующих чистых зон силифола. Результаты, представленные в виде мольного соотношения мономер (Va–г) – тиофосфат – иод приведены в табл. 1. При расчете полагали, что количество образовавшегося циклотиофосфата (VIIa–г) эквивалентно содержанию P<sub>S</sub>-групп и иода в исследуемом соединении. Значения R<sub>f</sub> и УФ-спектральные характеристики полученных соединений (VIIa–г) совпадали с таковыми для контрольных образцов, полученных нами ранее из мономеров (VIa–г) [5].

*Кинетика отщепления R<sup>+</sup>-группы в соединении (IIIa).* 2,3 мг (4 мкмоль) соединения (IIIa) растворяли в 0,05 мл воды и прибавляли 0,05 мл 2 н. LiOH. Кинетические измерения и расчет кажущейся константы скорости первого порядка осуществляли по методике, приведенной в работе [5]. Значение  $k_1 = 2,12 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $\tau_{1/2} = 328 \text{ с}$ .

Авторы благодарны А. В. Лебедеву за помощь в записи и интерпретации <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богачев В. С., Кумарев В. П. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1984, № 5, вып. 2, с. 123–130.
2. А. с. 910651 (СССР). Способ получения олигодезокситимидилатов/Кумарев В. П., Богачев В. С., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф. Заявл. 30.09.76, № 2414492. Оpubл. в Б. И., 1982, № 9.
3. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1525–1534.
4. А. с. 988824 (СССР). Способ получения подпроизводных дезокситионуклеотидов/Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Кобзева Н. С. Заявл. 01.11.79, № 2869154. Оpubл. в Б. И., 1983, № 2.
5. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1516–1524.
6. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 7, p. 2319–2326.
7. Микельсон А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М.: Мир, 1966, с. 510.
8. Jardetzky O., Roberts C. K. NMR in molecular biology. N. Y. etc.: Acad. Press, 1981, p. 187.
9. Вейганд К., Хильгетас Г. Методы эксперимента в органической химии. М.: Химия, 1968, с. 235.
10. Беккер Г. и др. Органикум. М.: Мир, 1979, т. 2, с. 353.

Поступила в редакцию  
12.V.1985

### PHOSPHOTHIOATE ANALOGUES OF NUCLEIC ACIDES. IV. THE SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ZWITTER-ION MONOMERS FOR PREPARATION OF 5'-PHOSPHOTHIOESTER ANALOGUES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

BOGACHEV V. S., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the  
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Zwitter-ion 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleoside-3'-O-(S-β-[N-(p-diethylmethylamino)phenyl]carbamoyl ethyl)phosphothioates used as key intermediates in the synthesis of 5'-phosphothioester analogues of oligodeoxynucleotides have been prepared by alkylation of N-protected 3'-phosphothioate derivatives of four major deoxyribonucleosides with 2-bromo-[N-(p-diethylmethylamino)phenyl]propionamide iodide in DMF followed by iodination with methyltriphenoxyphosphonium iodide in the same solvent. Nucleophilic reactions of the prepared compounds and Li<sup>+</sup> or Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> salts of thymidine-3'-phosphothioate in DMF at 22° C were found to have first and second order kinetics, respectively, the rate constants being estimated by iodometry. The reactivity of the new zwitter-ion 5'-iodo derivatives in both displacement reactions was shown to be by 3–5 and 40 times, respectively, greater than in case of the corresponding negatively charged compounds.