



УДК 577.113.4/5

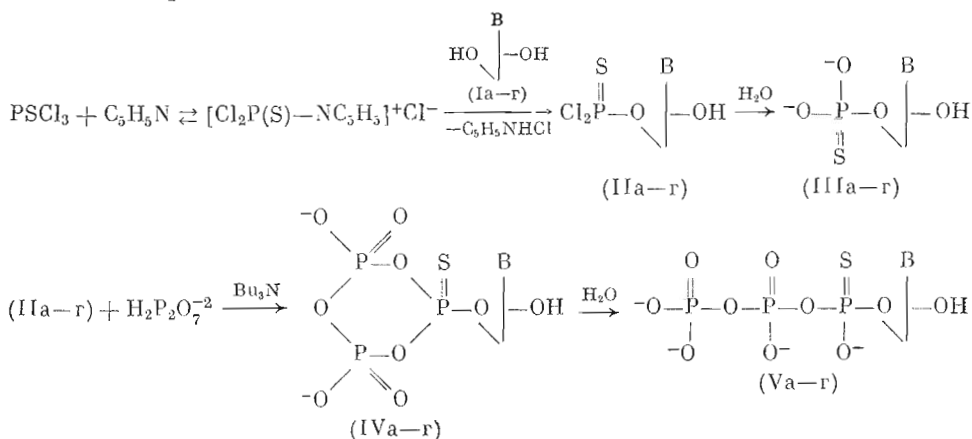
## УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СИНТЕЗ 5'-О-МОНОТИО- И 5'-О-(1-ТИО) ТРИФОСФАТОВ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ

Богачев В. С.

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

Тиофосфатные аналоги моно- и трифосфатов дезоксирибонуклеозидов ( $dNMP_s$  и  $dNTP_{as}$ ) находят широкое применение в области энзимологии и молекулярной биологии [1–3], особенно в исследованиях стереохимии ферментативных реакций, при синтезе  $P_s$ -содержащих ДНК [2, 3], в процессах сайт-направленного мутагенеза [4], а также при секвенировании ДНК [5]. Известные методы химического синтеза этих соединений [1, 6–9] довольно трудоемки и недостаточно эффективны (выходы  $dNMP_s$  25–80%,  $dNTP_{as}$  20–45%). Синтез  $dNMP_s$  осуществляют обычно селективным тиофосфорилированием дезоксирибонуклеозидов  $PCl_3$  в TEF и TMF в отсутствие оснований [8] или в присутствии 2,6-лутидина [9]. Обработывая пирофосфатом  $dNMP_s$ , активированные дифенилхлорфосфатом, получают  $dNTP_{as}$ . Целью настоящего исследования явилось усовершенствование способов синтеза указанных аналогов моно- и трифосфатов дезоксирибонуклеозидов.

Синтез проводили по схеме



где  $C_5H_5N$  — пиридин, Ia — Ade, Ib — Thy, Ic — Cyt, Id — Gua.

Принципиальные моменты данного подхода — выявление ключевой роли пиридина (а не TEF, как считал Юошикава [10]) как нуклеофильного и основного катализатора в реакции  $PCl_3$  с дезоксирибонуклеозидами и применение промежуточных активных дихлорангидридов (IIa–r) в реакции с пирофосфатом, гладко образующих сначала циклотрифосфаты (IVa–r), а затем, после обработки водой, и целевые тиотрифосфаты (Va–r). Определение порядка реакции  $PCl_3$  с дезоксирибонуклеозидами в TEF в присутствии пиридина при 0° C методом начальных скоростей показало, что ее кинетика следует закону третьего порядка. Реакция имеет

Принятые сокращения:  $dNMP_s$  — дезоксирибонуклеозид-5'-О-тиомонофосфат,  $dNTP_{as}$  — дезоксирибонуклеозид-5'-О-(1-тио)трифосфат,  $P_s$  — тиофосфат, TEF — триэтилфосфат, TMF — триметилфосфат.

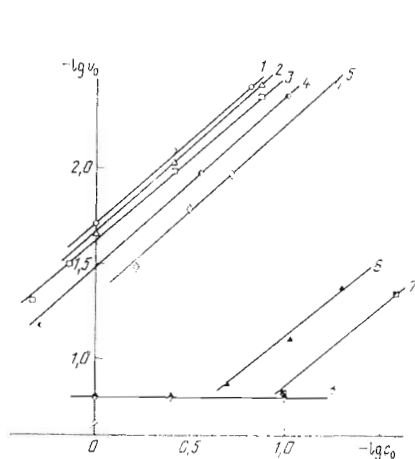


Рис. 1

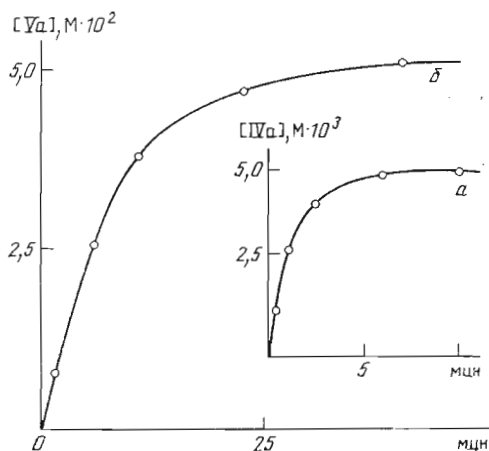


Рис. 2

Рис. 1. Зависимости начальной скорости реакции ( $v_0$ , моль/л) соединений (Ia–г) с  $\text{PSCl}_3$  в TEF в присутствии пиридина (Py) при  $0^\circ\text{C}$  от начальных концентраций ( $c_0$ , моль/л) реагентов в логарифмических координатах: 1 –  $c_0 = [\text{Py}]_0$ , 0,3 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,2 М dCyd; 2 –  $c_0 = [\text{Py}]_0$ , 0,15 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,1 М dGuo (в  $(\text{Me}_2\text{N})_2\text{CO}$ ); 3 –  $c_0 = [\text{Py}]_0$ , 0,3 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,2 М dThd; 4 –  $c_0 = [\text{PSCl}_3]_0$ , 0,2 М dThd, 0,4 М Py; 5 –  $c_0 = [\text{dThd}]_0$ , 0,3 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,4 М Py; 6 –  $c_0 = [\text{PSCl}_3]_0$ , 0,1 М dAdo, 0,2 М Py; 7 –  $c_0 = [\text{dAdo}]_0$ , 0,15 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,2 М Py; 8 –  $[\text{Py}]_0$ , 0,15 М  $\text{PSCl}_3$ , 0,1 М dAdo

Рис. 2. Кинетические кривые накопления: а – соединения (IVa) в реакции 0,05 М (IIa) с 0,15 М  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{-2}$  в смеси TEF – ацетонитрил (1:3) в присутствии 0,15 М  $n\text{-Bu}_3\text{N}$  при  $25^\circ\text{C}$ ; б – соединение (Va) в реакции гидролиза 0,005 М (IVa) в воде при  $25^\circ\text{C}$

первый порядок по каждому из реагентов, в том числе по пиридину (рис. 1), за исключением реакции с дезоксиаденозином, порядок которой по пиридину равен 0 (наклон прямой 8 на рис. 1 нулевой). Такой кинетике соответствует, наиболее вероятно, двухстадийный механизм реакции с очень быстрой обратимой первой стадией [11] (в нашем случае взаимодействие пиридина с  $\text{PSCl}_3$ ) и более медленной второй (у нас реакция трихлорида тиофосфопиридиния с дезоксинуклеозидом). В случае дезоксиаденозина роль нуклеофильного катализатора выполняет, вероятно, остаток аденозина и затем следует атака собственного 5'-гидроксила. Внутримолекулярный характер этой реакции подтверждается ее аномально высокой скоростью (ср. прямые 1–3 и 8 при 0,4 М концентрации пиридина, рис. 1). Скрининг растворителей и нуклеофильных оснований показал, что скорость реакции тиофосфорилирования уменьшается в рядах  $(\text{Me}_2\text{N})_2\text{CO} - \text{TMF} - \text{TEF} - \text{Me}_2\text{NCHO} - (\text{Me}_2\text{N})_3\text{PO}$  и пиридин – диметиламинопиридин – 2,4,6-коллиндин – N-метилимидазол. Из растворителей наиболее пригодным оказался TEF, но он плохо растворяет дезоксицитидин и дезоксигуанозин. Последние хорошо растворимы в TMF, тетраметилмочевине и гексаметилтрифосфамиде, однако первый из них способен метилировать пиридин и  $\text{P}_5$ -производные, во втором образуются побочные продукты с  $\text{PSCl}_3$ , а третий сильно замедляет реакцию тиофосфорилирования. Пиридин оказался лучшим из исследованных оснований, так как комплексы других приведенных выше оснований в  $\text{PSCl}_3$  плохо растворимы в TEF и TMF. Слишком большой (более 2–4 экв.) избыток пиридина по отношению к дезоксинуклеозиду в случае соединений (Iв, г) приводит к побочным реакциям по гетероциклическим основаниям, он не мешает в случае дезокситимидина, но ведет к диспропорционированию  $\text{dNTP}_{\text{ас}}$ . При увеличении температуры от 0 до  $20^\circ\text{C}$  скорость реакции возрастает в 4 раза, но уменьшается выход тиофосфатов (IIа–г) (до 85%), вероятно, вследствие нестабильности дихлоридов (IIа–г) в присутствии пиридина [12]. Оптимальные условия реакции тиофосфорилирования дезоксинуклеозидов приведены в таблице. Для получения тиотрифосфатов (Va–г) промежуточные хлорангидриды (IIа–г) обрабатывали 10 мин 0,25 М раствором пирофосфата (4 экв.,  $\text{Bu}_3\text{NH}^+$ -соль) в ацетонитриле в присут-

Синтезируемое соединение	Концентрация, М *			Время реакции, мин	Выход **, dNMP <sub>3</sub> , %	Выход (Va-r), %
	нуклеозида	PSCl <sub>3</sub>	пиридина			
dATP <sub>αs</sub>	0.20	0.22	0.40	10	97	92
dTTP <sub>αs</sub>	0.40	0.44	0.80	40	96	91
dCTP <sub>αs</sub>	0.20	0.40	0.40	120	90	85
dGTP <sub>αs</sub>	0.20	0.40	0.40	120	95	90

\* Дезоксиаденозин и тимидин растворяли в TEF, а дезоксицитидин и дезоксигуанозин — в TMF — TEF (1 : 1, по объему) при 110—120° С.

\*\* Определен после 5-мин обработки реакционной смеси (0,2 мл) 25% водным пиридином (0,5 мл) при 20° С с последующей хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0—1 М (рН 8,5).

ствии *n*-трибутиламина (3 экв.) при 25° С (рис. 2). Циклотиотрифосфаты (IVa—r) гидролизovali 45 мин и целевые тиотрифосфаты (Va—r) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте 0—1,0 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> с выходом 85—92% в виде пар диастереомеров. Разделение последних достигается ВЭЖХ на Nucleosil C<sub>18</sub> (5 мк) в градиенте 0—40% MeOH в 0,05 М LiClO<sub>4</sub>. Соединения (Va—r) были охарактеризованы данными ТСХ на силикагеле, ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ, УФ- и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектрами (в условиях, приведенных в работе [8]) на спектрометре Bruker HX-90 на частоте 36,43 МГц относительно 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (D<sub>2</sub>O/EDTA, рН 8,8). δ, м.д., на примере dATP<sub>αs</sub>: P<sub>α</sub> 43,30 (д) и 42,80 (д); P<sub>β</sub> 22,71 (дд); P<sub>γ</sub> 5,92 (д). Субстратные свойства синтезированных dNTP<sub>αs</sub> в реакции с ДНК-полимеразой I *E. coli* и устойчивость полученных при этом P<sub>3</sub>-аналогов ДНК к экзонуклеазе III соответствовали литературным данным [5].

Недавно в печати появилась работа [13], в которой сообщается о реализации той же идеи синтеза dNTP<sub>αs</sub>, что и в данном сообщении. Но незнание механизма реакции PSCl<sub>3</sub> с нуклеозидами не позволило авторам найти оптимальные условия синтеза хлоранидридов (IIa—r), что явилось причиной невысокого выхода целевых dNTP<sub>αs</sub> (35—45%). Так, они не поняли роли пиридина как нуклеофильного катализатора данной реакции, применив вместо него менее нуклеофильный 2,6-диметилпиридин, по данным [9] сильнее ускоряющий реакцию дезоксиаденозина с PSCl<sub>3</sub> в TEF, чем пиридин. Но по нашим данным нуклеофильный катализ не требуется только в этом единственном (!) случае. Слишком жесткие условия растворения нуклеозидов в TEF (180—216° С) для увеличения их концентрации в реакционной смеси, применение неоптимальных времени реакции дезоксинуклеозидов с PSCl<sub>3</sub> и гидролиза циклотиотрифосфатов (IVa—r) (об образовании которых авторы работы [13] не сообщают), а также использование в качестве растворителя TEF вместо TMF для тиофосфорилирования дезоксицитидина и дезоксигуанозина (вследствие чего реакция с ними протекала в гетерофазном режиме) — все это не позволило авторам работы [13] существенно повысить эффективность синтеза dNTP<sub>αs</sub>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Eckstein F., Gindl H. // Biochim. et biophys. acta. 1967. V. 149. № 1. P. 35—40.
2. Eckstein F. // Annu. Rev. Biochem. V. 54. Palo Alto, Calif. 1985. P. 367—402.
3. Eckstein F. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1983. V. 22. № 6. P. 423—459.
4. Ott J., Taylor J. M., Eckstein F. // 3 Meet. Bioorg. Chem. Liblice, 21—23 Apr. 1986. S. 1. S. A. 30.
5. Labeit S., Lehrach H., Goody R. S. // DNA. 1986. V. 5. № 2. P. 173—177.
6. Eckstein F., Goody R. S. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 8. P. 1685—1691.
7. Eckstein F. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 15. P. 4718—4723.
8. Potter B. V. L., Eckstein F. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 23. P. 14243—14248.
9. Moran J. R., Whitesides G. M. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 4. P. 704—706.

10. Yoshikawa M., Kato T., Takeshi T. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1969. V. 42. P. 3505–3508.
11. Корниш-Бойден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. С. 18.
12. Kraszewsky J., Stawinski J. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 30. P. 2935–2936.
13. Goody R. S., Isacov M. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 31. P. 3599–3602.

Поступило в редакцию  
31.VII.1987

## IMPROVED SYNTHESIS OF DEOXYNUCLEOSIDE 5'-O-MONOTHIOPHOSPHATES AND 5'-O-(1-THIO)TRIPHOSPHATES

BOGACHEV V. S.

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

Improved method for the synthesis of four major deoxynucleoside 5'-O-monothiophosphates and 5'-O-(1-thio)triphosphates has been developed. It is based on thiophosphorylation of unprotected deoxynucleosides with  $\text{PSCl}_3$  in triethyl- and trimethylphosphates in the presence of pyridine at  $0^\circ\text{C}$ . Intermediate dichlorothiophosphoryl derivatives upon aqueous treatment give deoxynucleoside 5'-O-monothiophosphates with 90–97% yields, converted and after reaction with  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{-2}$  into deoxynucleoside 5'-O-(1-thio)triphosphates (85–92% yields). The thiophosphorylation reaction is found to be of the first order with respect to each of the three reactants, pyridine being nucleophilic and basic catalyst. Two-stage mechanism of this reaction is suggested.