



УДК 577.113.(4+7)

© 1993 Е. В. Вязовкина, Н. И. Комарова, А. В. Лебедев

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВVII *. СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ДИАСТЕРЕОМЕРНЫХ ДЕЗОКСИДИНУКЛЕОЗИДМЕТИЛФОСФОНАТОВ*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск*

Синтезированы и разделены хроматографией все 16 пар диастереомеров дезоксидинуклеозидметилфосфонатов, энантиомерных по межнуклеозидному метилфосфонату. Установлено, что диастереомер, элюируемый первым при хроматографии на силикагеле, имеет большую подвижность и при хроматографии на обращенной фазе. Записаны УФ-спектры и спектры КД всех пар диастереомеров. Показано, что для элюируемого первым диастереомера по сравнению с менее подвижным вторым наблюдается более высокий уровень как гинохромного эффекта, так и эффекта Коттона в КД-спектре. Сделано предположение, что независимо от состава дезоксидинуклеозидметилфосфонатов все первые диастереомеры (так же как и все вторые) имеют одну и ту же абсолютную конфигурацию межнуклеотидного метилфосфонатного фрагмента.

Олигонуклеозидметилфосфонаты — неионные аналоги олигонуклеотидов, содержащие 5'-3'-метилфосфонатную связь, обладают особыми физико-химическими и биологическими свойствами [2, 3]: они способны образовывать стабильные комплементарные комплексы с ДНК и РНК; кроме того, они устойчивы по отношению к клеточным нуклеазам и способны эффективно проникать в клетку. В литературе описан ряд методов синтеза таких олигонуклеотидных аналогов:

1) синтез с применением конденсирующих реагентов, таких, как дициклогексилкарбодиимид, арилсульфонилхлориды или арилсульфонилтетразолиды [2, 4—6];

2) синтез с применением метилдихлорфосфина как бифункционного фосфонилирующего и конденсирующего реагента [7, 8];

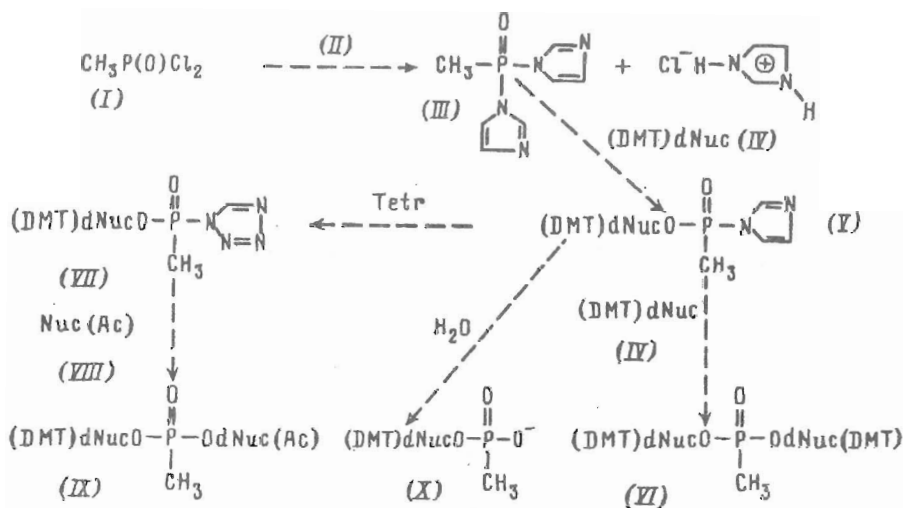
3) синтез с использованием комбинации метилфосфонодихлорида с арилсульфонилтетразолидом, как фосфонилирующего и конденсирующего реагентов соответственно [9—11].

Каждый асимметрический атом фосфора в синтезированных олигонуклеозидметилфосфонатах обуславливает возможность появления пары диастереомеров (необходимо учитывать наличие асимметрических атомов углерода в остатках нуклеозидов), что приводит к образованию $2n$ изомеров (n — число метилфосфонатных фрагментов). Физико-химические и биологические свойства индивидуальных диастереомеров могут значительно различаться. Целью настоящей работы был синтез всех 16 пар динуклеозидметилфосфонатов, разделение их на индивидуальные диастереомеры и получение их физико-хими-

* Сообщение VI см. [1]. Используются стандартные сокращения: *ib* — изобутирил, *Nuc* — нуклеозид; кроме того, *DMT* и *MMT* — диметокси- и монометокситритил, *Tetr* — тетразол.

ческих характеристик с целью дальнейшего определения абсолютных конфигураций.

Для синтеза дидезоксинуклеозидметилфосфонатов в растворе нами был адаптирован метод, разработанный Миллером [11] для синтеза метилфосфонатных производных олигонуклеотидов на полимерном носителе. В отличие от работы [11] фосфонирующий реагент — метилфосфонобисимидазол (III), образующийся при смешении метилфосфонодихлорида (I) с 5-кратным избытком имидазола (II), получали в абсолютном ацетонитриле, а осадок имидазолийхлорида отделяли перед добавлением 3'-ОН-нуклеозидного компонента (см. схему):



К полученному раствору метилфосфонобисимидазолида (III) добавляли расчетное количество 3'-ОН-нуклеозидного компонента (IV), растворенного в абсолютном пиридине (см. схему). В результате реакции образовывался соответствующий 5'-диметокситритилнуклеозид-3'-метилфосфоимидазолид (V) и побочный продукт (3'-3')-метилфосфондинуклеозид (VI). Последний получается при реакции 5'-диметокситритилнуклеозид-3'-метилфосфоимидазолидом (V). Для ускорения следующей стадии в реакционную смесь добавляли тетразол (Tetr). Образовавшийся 5'-диметокситритилнуклеозид-3-метилфосфонотетразолид (VII) реагирует далее с 5'-ОН-нуклеозидным компонентом (VIII), давая динуклеозидметилфосфонат (IX). Несмотря на образование побочного продукта (VI) и некоторое количество продуктов гидролиза (X), выход димера (IX) после хроматографии составлял 60—83%. Это позволяет считать такой метод синтеза приемлемым для получения коротких олигонуклеозидметилфосфонатов, таких, как димеры. В дальнейшем эта методика была использована для синтеза метилфосфонатных производных олигонуклеотидов от 2 до 7 звеньев (результаты будут опубликованы отдельно).

Для всех димеров удалось подобрать оптимальные условия разделения двух образовавшихся диастереомеров на колонке с силикагелем. В необходимых случаях для более полного разделения диастереомеров проводили рехроматографию полученных фракций. В табл. 1 представлены условия разделения для всех пар диастереомеров. Две пары диастереомеров, (DMT)ibdGp(CH₃)bzdA(Ac) и (DMT)dTp(CH₃)ibdG(Ac), удалось разделить в препаративном масштабе только после удаления 5'-диметокситритильной группы. Полученные индивидуальные диастереомеры обозначены номерами 1 и 2, в соответствии с порядком их выхода с колонки. Как видно из данных табл. 1, степень чистоты полученных диасте-

Хроматографические характеристики дезоксидинуклеозидметилфосфонатов

Соединение		Выход суммы диастереомеров, %	Условия разделения *		Аналитическая хроматография ^{2*}		R _t , мин ^{3*}
					содержание метанола, %	R _t , мин	
(DMT)ibdGp(CH ₃)ibdG(Ac)	1	72	А	0	5	5,91	15,65
	2			1		8,23	
(DMT)ibdGp(CH ₃)bzdA(Ac)	1	63	А ^{4*}	0	5	4,27	15,44
	2			5		4,00	
(DMT)ibdGp(CH ₃)dT(Ac)	1	71	А	0	3	7,95	16,06
	2			5		13,68	
(DMT)ibdGp(CH ₃)dC(Ac)	1	70	В	1	3	4,56	16,66
	2			5		4,93	
(DMT)bzdAp(CH ₃)ibdG(Ac)	1	83	В	0	5	3,55	15,54
	2			6		3,83	
(DMT)bzdAp(CH ₃)bzdA(Ac)	1	74	А	0	5	3,69	16,74
	2			0		4,58	
(DMT)bzdAp(CH ₃)dT(Ac)	1	66	А	0	5	2,56	17,06
	2			4		3,05	
(DMT)bzdAp(CH ₃)bzdC(Ac)	1	61	А	0	3	3,02	16,05
	2			5		3,37	
(DMT)dTp(CH ₃)ibdG(Ac)	1	60	А ^{4*}	0	3	8,39	14,40
	2			3		8,63	
(MMT)dTp(CH ₃)bzdA(Ac)	1	66	А	0	5	2,69	15,89
	2			3		2,89	
(MMT)dTp(CH ₃)dT(Ac)	1	65	А	0	3	3,93	16,26
	2			2		4,96	
(MMT)dTp(CH ₃)bzdC(Ac)	1	62	В	0	5	2,08	15,19
	2			0		2,10	
(DMT)bzdCp(CH ₃)ibdG(Ac)	1	68	В	0	5	3,42	12,69
	2			5		3,42	
(DMT)bzdCp(CH ₃)bzdA(Ac)	1	64	А	0	3	5,55	14,63
	2			3		6,90	
(DMT)bzdCp(CH ₃)dT(Ac)	1	71	А	0	5	2,08	15,75
	2			5		2,36	
(DMT)bzdCp(CH ₃)bzdC(Ac)	1	60	А	0	3	2,87	13,31
	2			6		3,31	

реомеров составляет от 94 до 100%. Для получения более полной характеристики в табл. 1 приведены времена удерживания диастереомеров при изократической хроматографии на силикагеле. Во всех случаях для 5'-ди- или 5'-монометокситритильных производных динуклеозидметилфосфонатов порядок выхода диастереомеров не изменялся по сравнению с препаративной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола.

После удаления всех защитных групп и выделения продуктов (см. «Экспериментальную часть») был проведен анализ фракций индивидуальных диастереомеров методом обращенно-фазовой хроматографии (табл. 1). По результатам препаративного разделения и анализа в выбранных нами хроматографических системах видно, что диастереомер, обозначенный номером 1, элюируется первым независимо от выбора растворителей, типа хроматографии, сорбента, наличия 5'-защитной группы (подобные результаты получены в работах 2, 12). Исключение составляет только димер $dGp(CH_3)dA$, для которого наличие или отсутствие 5'-диметокситритильной группы меняет порядок выхода диастереомеров при разделении на силикагеле. Таким образом, в подавляющем большинстве случаев различие в родстве к сорбентам определяется тем, в какой из двух конфигураций (R_p или S_p) находится асимметрический фосфор метилфосфонатного фрагмента димера.

Для природных динуклеозидмонофосфатов в водных растворах характерно наличие стэкинг-взаимодействия гетероциклических оснований, которое обычно регистрируется по эффекту гипохромии и спектрам кругового дихроизма. Для диастереомеров дезоксидинуклеозидметилфосфонатов $dAp(CH_3)dA$ ранее было показано, что величина эффекта гипохромии составляет 11 и 7% для первого и второго диастереомеров соответственно [2]. Величина эффекта гипохромии составляет от 1,5 до 16% для различных димеров, а конкретно для $dAp(CH_3)dA$ 13 и 4,5% (табл. 2), что практически совпадает с опубликованными результатами. Очевидно, что конфигурация метилфосфонатного фрагмента должна влиять на пространственное строение диастереомера, а следовательно, определять степень стэкинг-взаимодействия плоскостей оснований. Можно было ожидать, что лишь одна из конфигураций более благоприятна для стэкинг-взаимодействия. Из данных табл. 2 видно, что во всех случаях первый диастереомер показывает более высокую степень гипохромии, а следовательно, больший стэкинг гетероциклических оснований. (Хотя точность, с которой в работе определены величины эффектов гипохромии, недостаточно высока для количественных сопоставлений, полученные данные позволяют делать надежные качественные выводы.) Отметим, что в случае пуриновых димеров процент гипохромии выше, чем в случае пиримидиновых. Это согласуется с данными по стэкингу для природных дезоксидинуклеозидмонофосфатов [13].

Известно, что форма и амплитуда спектров КД динуклеозидмонофосфатов и их производных зависят не только от степени перекрытия плоскостей оснований, но и от их взаимного расположения в пространстве, т. е. наклона плоскостей

* Условия препаративного разделения на силикагеле см. «Экспер. часть»: А — градиент метанола в хлороформе, В — градиент метанола в смеси хлороформ — этилацетат, 1 : 1. Справа в колонке для каждого выделенного диастереомера указан процент примеси другого.

²* Условия аналитической хроматографии на силикагеле для полностью защищенных димеров см. «Экспер. часть». Точность определения $R_t \pm 1\%$, воспроизводимость $\pm 4\%$, относительная погрешность разности времен удерживания $(\Delta R_t' - \Delta R_t'')/R_t$ для пары диастереомеров составляет $\pm 0,4\%$ (где $\Delta R_t'$ и $\Delta R_t''$ — разность времен удерживания второго и первого диастереомеров в первом и втором экспериментах соответственно, а R_t — полусумма средних времен удерживания пары диастереомеров в первом и втором экспериментах).

³* R_t — время удерживания диастереомера в условиях аналитической хроматографии на обращенной фазе для полностью деблокированных димеров (см. «Экспер. часть»). Точность определения R_t составляет $\pm 0,2\%$, воспроизводимость $\pm 3\%$. Относительная погрешность разности времен удерживания пары диастереомеров $\pm 0,4\%$ (см. выше).

⁴* Препаративное разделение диастереомеров проведено после удаления диметокситритильной защитной группы.

Величины гипохромного эффекта и молярной эллиптичности для дезоксидинуклеозидметилфосфонатов

Соединение		Гипохромия, %	Молярная эллиптичность			
			λ_{\min}	$(\theta \cdot 10^{-2})$	λ_{\max}	$(\theta \cdot 10^{-2})$
dGp(CH ₃)dG	1	9,6±1,1	280	(-65)	253	(248)
	2	6,9±1,5	280	(-51)	259	(85)
dGp(CH ₃)dA	1	12,6±1,0	270	(-87)	250	(198)
	2	10,2±1,1	266	(-149)	250	(134)
dGp(CH ₃)dT	1	16,0±0,7	265	(-58)	284	(82)
	2	10,5±1,0	260	(-30)	284	(33)
dGp(CH ₃)dC	1	12,5±1,0	251	(-56)	280	(77)
	2	11,0±1,0	250	(-50)	280	(49)
dAp(CH ₃)dG	1	15,4±0,7	280	(-122)	*	
	2	5,8±1,8	276	(-107)		
dAp(CH ₃)dA	1	13,0±1,5	250	(-315)	270	(272)
	2	4,5±1,8	250	(-138)	270	(16)
dAp(CH ₃)dT	1	10,1±1,1	252	(-250)	274	(253)
	2	8,1±1,0	252	(-120)	274	(68)
dAp(CH ₃)dC	1	9,4±1,5	240	(-182)	273	(209)
	2	3,5±1,9	240	(-64)	273	(52)
dTp(CH ₃)dG	1	10,7±0,9	260	(-88)	285	(32)
	2	5,9±2,0	250	(-45)	285	(18)
dTp(CH ₃)dA	1	8,6±1,4	250	(-156)	271	(150)
	2	5,6±1,5	250	(-59)	271	(72)
dTp(CH ₃)dT	1	3,0±1,0	252	(-86)	277	(108)
	2	1,4±1,0	252	(-60)	277	(51)
dTp(CH ₃)dC	1	5,8±1,7	242	(-75)	284	(82)
	2	2,7±1,9	242	(-45)	284	(33)
dCp(CH ₃)dG	1	8,8±1,6	249	(-75)	278	(77)
	2	3,9±2,0	249	(-39)	276	(70)
dCp(CH ₃)dA	1	9,2±1,2	*		271	(160)
	2	3,4±1,8			271	(132)
dCp(CH ₃)dT	1	4,6±1,5	*		280	(200)
	2	3,0±1,8			277	(105)
dCp(CH ₃)dC	1	5,8±1,5	*		278	(179)
	2	3,7±1,4			275	(110)

* Явно выраженный максимум (минимум) отсутствует.

друг к другу [2, 14, 15]. Нами были получены КД-спектры всех 32 диастереомеров. Результаты представлены в табл. 2, в которой приведены значения молярной эллиптичности в максимуме и минимуме КД-спектра и соответствующие значения длин волн. КД-спектры всех 16 пар димеров имеют различные положения минимумов и максимумов и различные значения величин молярных эллиптичностей, что говорит о своеобразии формы стэкинга для каждого димера. Однако, если сравнить пары диастереомеров, видно, что положения минимумов и максимумов в их КД-спектрах совпадают или близки, тогда как значения молярных эллиптичностей всегда существенно больше по абсолютной величине для первого диастереомера (см. табл. 2). Исключение составляет случай $dGp(CH_3)dA$, для которого значение эллиптичности больше по абсолютной величине в положительной области для первого изомера, а в отрицательной — для второго.

В работе [15] было показано, что величина молярной эллиптичности в динуклеозидмонофосфатах зависит от взаимной ориентации плоскостей оснований: молярная эллиптичность имеет максимальное значение, если угол между плоскостями оснований составляет 45 или 135°, и уменьшается при приближении угла к значениям 0, 90, 180°. Тогда наиболее реальным кажется предположение о существовании наклонной взаимной ориентации плоскостей гетероциклических оснований для всех первых диастереомеров и ориентации плоскостей оснований, близкой к параллельной или перпендикулярной для вторых диастереомеров. Причиной такого различия пространственного строения диастереомеров, очевидно, является различие в конфигурациях метилфосфонатного фрагмента диастереомеров (R_p или S_p). В случае димера $dGp(CH_3)dA$ наклонная взаимная ориентация реализуется, вероятно, для обоих диастереомеров.

На основании результатов хроматографического разделения на прямой и обратной фазе, данных по гипохромии, спектров КД можно говорить об общих конфигурационных особенностях всех первых и соответственно всех вторых диастереомеров дезоксирибонуклеозидметилфосфонатов. Поскольку абсолютные конфигурации метилфосфонатных фрагментов по крайней мере двух пар диастереомеров, $dAp(CH_3)dT$ и $dTp(CH_3)dT$, установлены [16, 17] (R_p для первых и S_p для вторых), по аналогии можно полагать, что абсолютная конфигурация всех первых диастереомеров дезоксирибонуклеозидметилфосфонатов — R_p , а вторых — S_p . Убедительные доказательства в пользу правомочности такого заключения приведены в работе [18].

Экспериментальная часть

Использовали защищенные по 5'-концу и гетероциклическим основаниям 2'-дезоксирибонуклеозиды $(DMT)bz dA$, $(DMT)bz dC$, $(DMT)ib dG$, $(DMT)dT$ (ABN, США); $(MMT)dT$ синтезировали по методике [19]. Защищенные по 3'-концу и гетероциклическим основаниям дезоксирибонуклеозиды синтезировали по [20]. Использовали метилфосфонодихлорид и тетразол (Aldrich, США), имидазол (Fluka, Швейцария). Пиридин и ацетонитрил перегоняли над пятиокисью фосфора и хранили над гидридом кальция. Синтезы проводили в сухой камере. Для анализа реакционных смесей и подбора условий разделения изомеров использовали хроматографические пластинки HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck, ФРГ).

Синтез динуклеозидметилфосфонатов проводили по методике [11] с некоторыми изменениями. Использовали следующие соотношения реагентов: 3'-нуклеозидный компонент (1 экв.), 5'-нуклеозидный компонент (1 экв.), имидазол (5 экв.), тетразол (2 экв.), $P(CH_3)(O)Cl_2$ (1,1 экв.). Масштаб синтеза составлял 1 ммоль в расчете на 3'-нуклеозидный компонент.

Метилфосфонодихлорид растворяли в абсолютном ацетонитриле до получения 3 М раствора. Имидазол сушили в течение 1 сут в вакуумном эксикаторе над пятиокисью фосфора, растворяли в абсолютном ацетонитриле до концентрации

2,5 М и добавляли расчетное количество раствора метилфосфонодихлорида. Смесь выдерживали 30 мин (при 15—20° С), осадок гидрохлорида имидазолия отфильтровывали. Полученный раствор метилфосфонобисимидазолида использовали для дальнейшего синтеза.

Защищенный 3'-ОН-нуклеозидный компонент сушили в вакуумном эксикаторе над пятиокисью фосфора в течение 1 сут и растворяли в абсолютном пиридине до концентрации 1 М. Полученный раствор добавляли по каплям к раствору метилфосфонобисимидазолида в течение 10—15 мин при непрерывном перемешивании. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ТСХ. Отбирали аликвоты (5 мкл), добавляли 50 мкл 50% водного пиридина, выдерживали 5 мин, упаривали смесь досуха, растворяли остаток в 50 мкл хлороформа и анализировали в системе 5% метанол — хлороформ. Окончание реакции (1—1,5 ч) определяли по исчезновению исходного нуклеозида. Полученный раствор нуклеозидметилфосфоноимидазолида использовали в синтезе динуклеозидметилфосфоната.

Защищенный 5'-ОН-нуклеозидный компонент и тетразол сушили в вакуумном эксикаторе над пятиокисью фосфора в течение 1 сут, растворяли в абсолютном пиридине до концентрации 1—2 М и добавляли к раствору эквимольного количества нуклеозидметилфосфоноимидазолида в пиридине. По окончании реакции (1—1,5 ч, контроль ТСХ) смесь растворяли в хлороформе (50 мл), экстрагировали равным объемом 1 М раствора бикарбоната натрия и промывали 3 раза водой. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и хроматографировали на силикагеле. Фракцию динуклеозидметилфосфоната упаривали и осаждали в гексан из хлороформа. Разделение диастереомеров динуклеозидметилфосфонатов проводили на хроматографе Waters.

Удаление защитных групп с гетероциклических оснований и 3'-ацетильной группы диастереомеров динуклеозидметилфосфонатов проводили по аналогии с методикой [11], разработанной для синтеза олигонуклеозидметилфосфонатов на полимерном носителе. Защищенный динуклеозидметилфосфонат (10 мг) растворяли в 1 мл смеси абсолютного этилендиамина и абсолютного этанола (1 : 1) и выдерживали 2 ч при 20° С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 80% уксусной кислоте и выдерживали 30 мин (в случае диметокситритильной группы) или растворяли в 5% трифторуксусной кислоте и выдерживали 5 мин (в случае монометокситритильной группы). Смесь нейтрализовали насыщенным раствором бикарбоната натрия, раствор упаривали досуха, растворяли в воде и выделяли продукт методом обращенно-фазовой хроматографии.

Препаративную хроматографию (количество вещества от 10 мкмоль до 1 ммоль) на силикагеле проводили на стеклянной колонке (5×20 см) с сорбентом Silasorb 600 (диаметр частиц 5 мкм; Chemapol, ЧСФР), 50—100 мкм, в градиенте концентрации метанола (от 0 до 10%) в хлороформе. Скорость элюции 10 мл/мин; объем элюента 2000 мл. Для дополнительной очистки и разделения диастереомеров проводили хроматографию на хроматографе Waters 600E (США), оборудованном спектрофотометрическим детектором модели 484 (Waters, США) на стальной колонке (1×50 см) с силикагелем Silasorb 600 (диаметр частиц 5 мкм) в градиенте концентрации метанола (от 0 до 10%) в хлороформе или смеси хлороформ — этилацетат (1 : 1). Скорость элюции 6 мл/мин; объем элюента 250 мл. Для стабилизации диметокситритильной защитной группы в элюент добавляли 0,5% пиридина.

Препаративную обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Waters на стальной колонке (0,4×20 см) с сорбентом Silasorb SPH C-18 (диаметр частиц 5 мкм; Chemapol, ЧСФР) в градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 35%) в воде со скоростью 2 мл/мин. Объем элюента 50 мл.

Определение времен удерживания динуклеозидметилфосфонатов на колонке в аналитическом варианте (количество вещества 0,01—0,05 мкмоль) проводили на хроматографе «Милихром» (НПО «Научприбор», Орел), оборудованном встро-

енным спектрофотометрическим детектором. Для хроматографии на силикагеле использовали стальную колонку (2×64 мм) с сорбентом Silasorb 600 (диаметр частиц 5 мкм) в системах растворителей: 3 или 5% метанола в хлороформе, скорость элюции 100 мкл/мин. Для обращенно-фазовой хроматографии использовали колонку (2×64 мм) с сорбентом Lihrosorb RP-18 (диаметр частиц 5 мкм; Merck, ФРГ); ступенчатая элюция по 400 мкл (5, 10, 20, 30, 40%) метанола в 0,02 М буфере трис-ацетата, pH 8; скорость элюции 100 мкл/мин.

Оптическое поглощение образцов измеряли при 20° С на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, ГДР). Запись спектров кругового дихроизма проводили на спектрополяриметре J-600 (Jasco, Япония) при 15° С. Использовали буфер: 1 М NaCl, 0,01 М NaH₂PO₄, 0,6 мМ EDTA, pH 7.

Измерения величины гипохромного эффекта и концентрации динуклеозид-метилфосфонатов проводили на длине волны 260 нм. Раствор диастереомера динуклеозидметилфосфоната в буфере (см. выше) делили на две части. Одну часть использовали для измерения оптического поглощения $A_0(\text{H}_2\text{O})$, а в другую добавляли КОН (до концентрации 1 М) для расщепления межнуклеозидной метилфосфонатной связи (по аналогии с работой [21]). По окончании реакции (30 мин, 20° С) измеряли оптическое поглощение $A_\infty(\text{OH}^-)$. Оптическое поглощение образца, приведенное к нейтральной среде $A_\infty(\text{H}_2\text{O})$, рассчитывали по формуле (с учетом разбавления)

$$A_\infty(\text{H}_2\text{O}) = A_\infty(\text{OH}^-) [\epsilon_{mi}(\text{H}_2\text{O}) / \epsilon_{mi}(\text{OH}^-) + \epsilon_{mj}(\text{H}_2\text{O}) / \epsilon_{mj}(\text{OH}^-)] / 2,$$

где $\epsilon_{mi}(\text{H}_2\text{O})$, $\epsilon_{mi}(\text{OH}^-)$, $\epsilon_{mj}(\text{H}_2\text{O})$ и $\epsilon_{mj}(\text{OH}^-)$ — молярные коэффициенты поглощения 2'-дезоксинуклеозидов (i и j), входящих в состав димера, в буфере (H₂O) и 1 М КОН (OH⁻) соответственно. Концентрацию (C) раствора диастереомера рассчитывали по формуле

$$C = A_\infty(\text{H}_2\text{O}) / [\epsilon_{mi}(\text{H}_2\text{O}) l],$$

где l — длина оптического пути (всегда была 1 см).

Величину эффекта гипохромии рассчитывали по формуле

$$A_\infty(\text{H}_2\text{O}) - A_0(\text{H}_2\text{O}) / A_\infty(\text{H}_2\text{O}) \cdot 100\%.$$

Использованы следующие молярные коэффициенты поглощения ($\epsilon \cdot 10^{-4}$, М⁻¹·см⁻¹; 260 нм): dA — 15,4 (H₂O), 15,3 (OH⁻); dT — 8,7 (H₂O), 6,3 (OH⁻); dG — 11,5 (H₂O), 11,55 (OH⁻); dC — 7,4 (H₂O), 6,7 (OH⁻).

Авторы выражают благодарность С. Г. Лохову за помощь в записи спектров кругового дихроизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вторушина И. А., Горбунов Ю. А., Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Лебедев А. В., Лохов С. Г., Манаенко Ф. В., Синяков А. Н., Шишкина И. Г. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 92—99.
2. Miller P. S., Yano J., Carrol C., Jayaraman K., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5134—5143.
3. Kan L.-S., Cheng D. M., Miller P. S., Yano J., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 10. P. 2122—2132.
4. Miller P. S., McParland K. B., Jayaraman K., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 7. P. 1874—1880.
5. Jayaraman K., McParland K. B., Miller P. S., Ts'o P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537—1541.
6. Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. B. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9659—9665.
7. Sinha N. D., Grossbruchaus V., Koser H. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 9. P. 877—880.

8. Engels J., Jager A.//*Angew. Chem.* 1982. № 12. P. 931—933.
9. Agarwal K. L., Riftingina F.//*Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. № 9. P. 3009—3024.
10. Miller P. S., Angris C. H., Blandin M., Murakami A., Reddy P. M., Spitz S. A., Ts'o P. O. P.//*Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 15. P. 5189—5204.
11. Miller S. P., Reddy M. P., Murakami A., Blake K. P., Lin S.-B., Agris C. H.//*Biochemistry.* 1986. V. 25. № 18. P. 5092—5097.
12. Lesnikowski Z. J., Jaworska-Maslanka M., Stec W. J.//*Nucleosides and Nucleotides.* 1991. V. 10. № 1—2. P. 733—736.
13. Cantor C. R., Tinoco I.//*J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. № 1. P. 65—85.
14. Kondo N. S., Fang K. N., Miller P. S., Ts'o P. O. P.//*Biochemistry.* 1972. V. 11. № 11. P. 1991—2003.
15. Ts'o P. O. P.//*Basic Princ. Nucl. Acid Chem.* 1974. V. 2. P. 305—326.
16. Chaco K. K., Lindner K., Saenger W., Miller P. S.//*Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 9. P. 2801—2814.
17. Lesnikowski Z. J., Jaworska M., Stec W. J.//*Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 24. P. 11675—11689.
18. Вязовкина Е. В., Энгельс И. В., Лебедев А. В.//*Биоорган. химия.* 1993. Т. 19. № 2.
19. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. № 23. P. 3821—3827.
20. *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*/Eds Zorbach W. W., Tipson R. S. N. Y.: Wiley, 1986. V. 1.
21. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. R., Murakami A., Reddy M. P., Spitz S. A., Ts'o P. O. P.//*Biochemie.* 1985. V. 67. № 7—8. P. 769—776.

Поступила в редакцию
22.XI.1991
После доработки
16.VI.1992

E. V. VYAZOVKINA, N. I. KOMAROVA, A. V. LEBEDEV
INVESTIGATION OF DIASTEREOMERS OF NON-IONIC
OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES.
VII. SYNTHESIS AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS
OF DIASTEREOMERIC DEOXYRIBODINUCLEOSIDE
METHYLPHOSPHONATES

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk*

All 16 pairs of deoxyribodinucleoside methylphosphonates with enantiomeric phosphorus configurations were synthesized and separated by silica gel chromatography. It was shown that the order of elution of the diastereomers, within each pair, is the same both upon silica gel and RP-chromatography. Hypochromicity and molecular ellipticity, are higher, in all cases, for the diastereomer with a higher chromatographic mobility, than for its counterpart. Based upon these facts, all the diastereomers with a higher mobility are suggested to have an identical absolute configuration at the P-atom, whereas all the diastereomers with lower mobility have the opposite configuration at that atom.