



УДК 547.962.32 : 541.63

НЕГЛИКОЗИДНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

XI. КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ ОКСИАЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ*Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мйшарин А. Ю.,
Гадюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Изучены спектры КД 17 оксиалкильных производных нуклеиновых оснований. Определено влияние хиральности отдельных атомов пентафуранозного цикла на эффект Коттона. Предложена аддитивная схема учета конфигурационного вклада в КД нуклеозидов. Обсуждается влияние конформации фуранозного цикла на КД нуклеозидов.

КД нуклеозидов является в сущности наведенным. Сами нуклеиновые основания ахиральны, и КЭ (Коттон-эффект) в полосах поглощения возникает за счет взаимодействия момента перехода основания с моментами переходов хирального остатка сахара, поглощающего в вакуумном ультрафиолете. Естественно, знак и амплитуда КЭ зависят не только от конфигурации углевода, но и от относительной ориентации нуклеинового и фуранозного циклов. Многочисленные экспериментальные [1—12] и теоретические [13—15] исследования позволили установить основные качественные закономерности весьма сложной и во многом противоречивой проблемы КД нуклеотидов. При этом выявился целый ряд противоречий как в трактовке природы переходов, так и в конкретной зависимости КЭ от конформации относительно гликозидной связи.

Ранее был предложен ряд эмпирических правил, связывающих знак и амплитуду КЭ с конфигурацией молекулы, в частности правила квадрантов и октантов. Однако эти концепции удастся успешно использовать лишь для конформационно жестких молекул. В случае конформационно подвижных молекул проблема осложняется тем, что КЭ зависит не столько от конфигурации хиральной части молекулы, сколько от конформационных факторов, определяющих относительное расположение момента перехода хромофора и хиральной части молекулы. Именно к таким соединениям и относятся нуклеозиды и нуклеотиды, в которых различие в энергиях конформеров и барьеры их равновесного взаимопревращения весьма низки.

Одним из наиболее плодотворных подходов к исследованию природы КД нуклеозидов является, вероятно, изучение влияния конфигурации при отдельных хиральных центрах рибофуранозного остатка на КД нуклеозидов в полосах поглощения нуклеинового основания. Такой подход предполагает, что в первом приближении можно пренебречь возмущающим влиянием хиральных центров друг на друга, иными словами, считать вклады хиральных центров во вращательную силу перехода аддитивными.

Теоретические исследования Майлса и др. [3] и эксперименты Вольтера [16], показавших, что магнитное поле напряженностью 70 кГс не возмущает заметно природного КД нуклеозидов, позволяют считать такой подход правомерным.

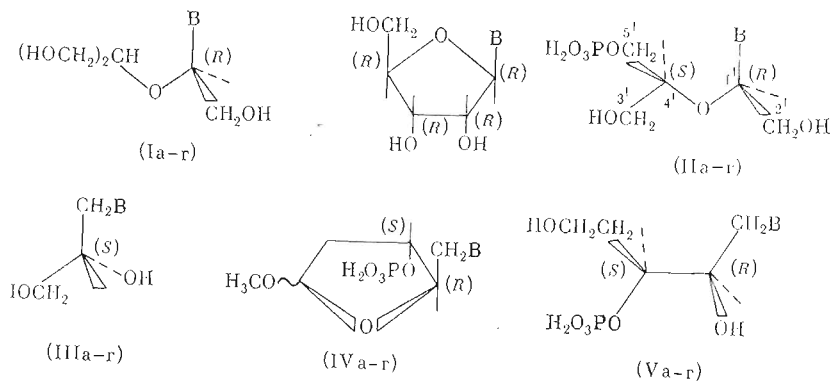
Таким образом, вращательную силу перехода (R_{OA}) можно представить как сумму вкладов, обусловленных асимметрическими центрами хиральной части молекулы:

$$R_{OA} = \sum R_{OA}^i$$

Было показано [3], что знак КЭ пиримидиновых нуклеозидов определяется в основном двумя факторами: конфигурацией аномерного атома углерода и конформацией нуклеозида относительно гликозидной связи. Положительный КЭ характерен для *анти*-конформации β -аномеров и *син*-конформации α -аномеров. Естественно, что вклады остальных хиральных центров также зависят от их конфигурации и конформации молекулы нуклеозида, хотя абсолютная величина вклада уменьшается с удалением хирального центра от хромофора.

Настоящее исследование представляет собой попытку вычленить конформационный и конфигурационный вклады в КЭ нуклеозидов и нуклеотидов, что является необходимым этапом более глубокого понимания природы КД этих соединений.

Были изучены спектры КД аналогов нуклеозидов и нуклеотидов, в которых фуранозный цикл заменен конформационно подвижным ациклическим хиральным заместителем (см. схему). Выбор именно этих соединений



a: B = Cyt; б: B = Ura; в: B = Ade; г: B = Gua

определялся следующими основными причинами. Трис(оксиметильные) производные (Ia — г) (для удобства сравнения и учитывая генетическую связь с рибофуранозидами, мы сохранили нумерацию атомов, принятую для нуклеозидов) обладают лишь одним хиральным центром при C1' с конфигурацией, подобной природным нуклеозидам. Их 5'-фосфаты (IIa — г) хиральны и при C1'- и при C4'-атомах, что позволяет, сравнивая их с соединениями (I), вычленить влияние хиральности при C4' на КЭ нуклеозидов. Оба атома обладают хиральностью, сходной с природной. (S)-2',3'-Диоксипропильные производные нуклеиновых оснований (IIIa — в) имитируют хиральность при атоме C2' нуклеозидов. Оба хиральных центра в 2'(R), 3'(S), 5'-триоксипентильных производных (Va, в) энантиомерны соответствующим центрам нуклеозидов. Сравнение спектров КД этих соединений со спектрами КД диоксипропильных производных может оказаться полезным при оценке вклада хиральности при C3' в КЭ нуклеозидов. Таким образом, исследуемый набор соединений позволяет судить о влиянии всех хиральных центров рибофуранозного цикла на КД нуклеозидов в полосах поглощения нуклеиновых оснований. Наконец, соединения (IVa, в) также энантиомерны нуклеозидам, но, кроме

Трис(оксиметильные) аналоги нуклеозидов и нуклеотидов

| Соединение | Метод получения | Выход, % | Спектр ПМР | | | | | |
|------------|-----------------|----------|---------------------|------------------------------|----------|------------|--------------------|---|
| | | | Растворитель | δ , м. д. (J , Гц) | | | | |
| | | | | 6-Н(8-Н) | 5-Н(2-Н) | 1'-Н | 2'-СН ₂ | 3'-СН ₂ и 4'-СН ₂ |
| (Ia) | А | 37 | D ₂ O | 7,51д(8,0) | 6,05д | 6,00т(5,0) | 3,78—3,95м | |
| (IIa) | Б | 61 | D ₂ O | 7,85д(7,5) | 6,11д | 5,95т(5,0) | 3,70—3,95м | |
| (Iб) | А | 48 | D ₂ O | 7,79д(8,0) | 5,88д | 5,97т(5,0) | 3,70—3,90м | |
| (IIб) | Б | 72 | D ₂ O | 7,83д(8,0) | 5,90д | 5,90т(5,0) | 3,70—3,95м | |
| (Iв) | А | 55 | DMSO-d ₆ | 8,68с | 8,55с | 6,30т(5,0) | 4,32м | 3,64м* |
| | | | D ₂ O | 8,32с | 8,09с | 6,00т(5,0) | 4,11д | 3,77м и 3,50м |
| (IIв) | Б | 76 | D ₂ O | 8,41с | 8,09с | 6,05т(5,0) | 4,08д | 3,85м |
| (Iг) | Б | 12 | D ₂ O | 8,04с | — | 5,85т(5,0) | 4,00д | 3,80м |

* Другие сигналы: 6-NH₂ 7,5 уширенный с; 2',3' и 5'-ОН 5,57т(5,7); 5,14т(5,0) и 4,90т(5,7).

того, обладают фуранозным циклом, присоединенным к нуклеиновому основанию через метиленовую группу (изучена смесь α - и β -аномеров в соотношении, близком 1 : 1).

(S)-2',3'-Дигидропропильные производные цитозина (IIIa), урацила (IIIб) и аденина (IIIв) синтезированы по описанному ранее методу [17], соединения (IVa, б) и (Va, б) — по методу [18].

Трис(оксиметильные) производные (Ia — г) и (IIa — г) получены окислительным расщеплением *cis*-гликольной группировки природных нуклеозидов или их 5'-фосфатов периодатом натрия с последующим восстановлением промежуточно образующихся диальдегидов боргидридом натрия.

В литературе описан ряд методов получения отдельных соединений интересующего нас ряда [19—22]. Однако эти методы не универсальны, неудобны при синтезе значительных количеств продукта, и, кроме того, в работах отсутствуют убедительные доказательства строения и чистоты полученных соединений. В связи с этим нами были разработаны методы синтеза трис(оксиметильных) производных, одинаково приемлемые для превращения всех четырех природных нуклеозидов и 5'-нуклеотидов. В случае окисления нуклеозидов полное ацилирование триолов позволило легко освободиться от неорганических солей экстракцией в органический растворитель (метод А) и после удаления ацетильных групп получить соединения (Ia — г) в кристаллическом виде с удовлетворительными выходами (табл. 1). Для окончательной очистки аналогов нуклеотидов (IIa — г) была использована ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе (метод Б). Чистоту полученных соединений контролировали хроматографически, а в случае 5'-фосфатов также электрофоретически. Строение полученных соединений доказано УФ-спектрами (табл. 2) и спектрами ПМР (табл. 1). Наличие в спектрах ПМР всех соединений триплетного сигнала 1'-Н указывает на присутствие в молекуле 2'-СН₂-группы. Кроме того, в спектре соединения (Iв), снятом в гексадейтеродиметилсульфоксиде, наблюдаются три триплетных сигнала гидроксильных протонов, однозначно указывающих на наличие трех оксиметильных групп.

В табл. 2 приведены спектральные характеристики изученных соединений. Для обозначения спектральных переходов использована общепринятая номенклатура [23, 24]. Однако не следует забывать, что в случае пиримидиновых соединений эта номенклатура не отражает истинную природу хромофора, являющегося скорее еноновым, а не ароматическим [13].

Как видно из табл. 2, УФ-спектры изученных соединений незначительно отличаются от спектров соответствующих нуклеозидов.

Поскольку спектры КД существенно зависят от конформации изучаемых соединений, необходимо рассмотреть пространственные взаимодействия

Спектральные свойства аналогов нуклеозидов и нуклеотидов

| Соединение | pH | УФ-спектры | Спектры КД | | |
|-------------|----|---|--|--------------|------------|
| | | $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ) | $\lambda_{\text{экстр}}$, нм ($\Delta\epsilon$) | | |
| | | | B_{211} | B_{111} | B_{111} |
| Urd | 1 | 262(10 100) | 267(2,52) | 238(-1,33) | 222(-0,97) |
| | 7 | 262(10 500) | 267(2,36) | | |
| | 13 | 262(7 500) | 265(3,48) | | |
| (Iб) | 1 | 262(9 600) | 277(0,06) | 246(-2,30) | |
| | 7 | 262(10 400) | 272(0,12) | 246(-2,39) | |
| | 13 | 262(6 700) | 264(0,70) | 235(-2,36) | |
| (IIб) | 1 | 262(8 100) | 278(0,09) | 246(-2,15) | |
| | 7 | 262(10 400) | 267(0,61) | 246(-2,33) | |
| | 13 | 262(6 100) | | 237(-2,67) | |
| (IIIб) | 1 | 266(9 900) | 266(-1,97) | 233(0,36) | |
| | 7 | 267(9 800) | 266(-1,64) | 233(0,64) | |
| | 13 | 265(6 900) | 263(-2,39) | | |
| iPd-(IIIб)* | 7 | 266(7 900) | 267(-1,24) | 233(0,21) | |
| Cyd | 1 | 281(12 600) | 282(1,91) | | |
| | 7 | 272(8 400) | 272(3,06) | | |
| | 13 | 273(8 400) | 272(2,79) | | |
| (Iа) | 1 | 281(12 900) | 278(1,18) | | |
| | 7 | 272(6 900) | 270(-1,24) | 234(0,85) | |
| | 13 | 273(8 900) | 269(-0,89) | 234(0,24) | |
| (IIа) | 1 | 281(13 000) | 274(-1,91) | | |
| | 7 | 273(8 500) | 267(-1,97) | 233(1,55) | |
| | 13 | 273(9 000) | 268(-1,82) | 233(0,27) | |
| (IIIа) | 1 | 282(12 500) | 282(-1,55) | | |
| | 7 | 273(9 000) | 272(-2,03) | | |
| | 13 | 273(8 800) | 271(-2,15) | | |
| iPd-(IIIа) | 7 | 275(8 200) | 272(-1,45) | | |
| (IVа) | 1 | 282(7 900) | 281(2,70) | | |
| | 7 | 274(5 400) | 272(1,50) | | |
| | 13 | 274(5 400) | 272(1,44) | | |
| (Va) | 1 | 283(11 600) | 280(1,74) | | |
| | 7 | 275(8 200) | 272(2,73) | | |
| | 13 | 275(8 600) | 272(2,70) | | |
| Ado | 1 | 257(15 100) | 253(-0,90) | | 229(0,15) |
| | 7 | 259(15 400) | 262(-1,12) | | 229(0,55) |
| | 13 | 261(15 400) | 267(-1,27) | | 231(0,33) |
| (Iв) | 1 | 257(15 800) | | | |
| | 7 | 261(15 100) | 264(-0,27) | 240(0,39) | |
| | 13 | 261(15 300) | 260(-0,76) | | |
| (IIв) | 1 | 257(15 700) | | 244(-0,18) | |
| | 7 | 261(14 700) | | 244(0,55) | |
| | 13 | 261(14 900) | 262(-0,42) | | |
| (IIIв) | 1 | 258(14 500) | 260(-0,30) | 235(-0,30)** | |
| | 7 | 262(14 600) | 260(-0,30) | 240(-0,15)** | |
| | 13 | 262(14 600) | 268(-0,30) | 252(-0,30) | |
| (IVв) | 1 | 258(11 000) | 270(0,18)** | | 230(0,56) |
| | 7 | 262(11 600) | 260(-0,36) | | |
| | 13 | 262(11 600) | 260(-0,40) | | |
| (Vв) | 1 | 258(12 800) | 260(-0,10) | | |
| | 7 | 262(13 600) | 260(-0,22) | | |
| | 13 | 262(13 400) | 260(-0,22) | | |

* iPd — 2',3'-O-изопропилиденовое производное.

** Перегиб кривой.

| Соединение | pH | УФ-спектры | Спектры КД | | |
|------------|----|--|---|--------------|-----------|
| | | $\lambda_{\text{макс. нм}} (\epsilon)$ | $\lambda_{\text{экстр. нм}} (\Delta\epsilon)$ | | |
| | | | B_{2u} | B_{1u} | B_{1u} |
| Guo | 1 | 256(11 000) 278(7 000) | 278(-0,27) | 250(0,36) | |
| | 7 | 254(11 000) 271(9 100) | 275(-0,21)** | 256(-0,48) | |
| | 13 | 258(9 600) 268(9 600) | 266(-0,88)** | 251(-1,27) | |
| (Iг) | 1 | 256(10 500) 278(7 100) | 280(-0,52) | | |
| | 7 | 254(11 200) 271(7 800) | 275(-0,33)** | 259(-0,42) | |
| | 13 | 258(9 800) 268(9 800) | 270(-1,33) | 255(-0,88)** | 230(0,55) |
| (IIг) | 1 | 256(13 000) 278(7 800) | 280(-0,55) | 253(-0,21) | 232(0,15) |
| | 7 | 254(12 400) 271(8 400) | 270(-0,60)** | 252(-1,21) | |
| | 13 | 258(10 600) 267(10 800) | 262(-1,64) | 254(-1,42)** | |

ствия, определяющие конформационную ситуацию. Для описания конформации относительно гликозидной связи мы в дальнейшем будем использовать двугранный угол γ , образованный плоскостями $C1'-N1(N9)-C6(C8)$ и $N1(N9)-C1'-H1'$. Угол γ равен нулю, когда связи $N1(N9)-C6(C8)$ и $C1'-H1'$ находятся в заслоненной конформации, и

изменяется от 0 до 360° при вращении дальней связи по часовой стрелке (взгляд от $N1(N9)$ к $C1'$). В случае соединений (III), (IV) и (V) за исходную принята конформация, в которой атом 6-Н (8-Н) заслонен с *pro(S)* $1'-H$ (рис. 1). Конформации со значениями γ , лежащими около 0° (360°), мы будем называть *син*-подобными, а со значениями γ , близкими к 180° , — *анти*-подобными. Конформация фуранозного цикла рассматривается в терминах концепции псевдоповращения, которую впервые ввели в химию нуклеозидов Альтона и Сундаралингам [25, 26].

Исследованиями последних лет показано, что, как правило, в водных растворах нуклеозиды представляют собой равновесную смесь конформеров, причем разность свободных энергий конформеров весьма невелика

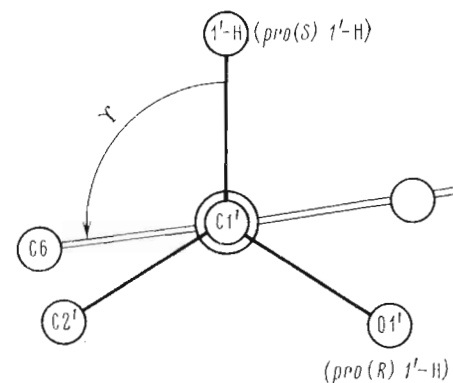


Рис. 1. Измерение двугранного угла γ вдоль $C1'-N1(N9)$ связи (взгляд от $C1'$ к $N1(N9)$). В пуриновых нуклеозидсах место $C6$ занимает $C8$. В скобках обозначено расположение атомов $1'-CH_2$ -группы негликозидных аналогов нуклеозидов

[27—30], а энергетические барьеры взаимопревращения не превышают 6—10 ккал/моль [31, 32]. Общая конформационная ситуация в растворах нуклеозидов складывается из конформации вокруг гликозидной связи (равновесие *син*- и *анти*-конформеров), конформации фуранозного цикла (равновесие *N*- и *S*-конформеров [25]) и конформации относительно $C4'-C5'$ -связи (равновесие *гош-гош*-, *гош-транс*- и *транс-гош*-ротамеров). Ряд экспериментальных [33, 34] и теоретических исследований [25, 35,

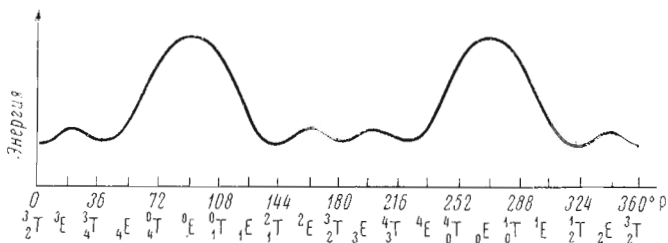


Рис. 2. Схематическое изображение изменения энергии на пути псевдовращения в зависимости от величины фазового угла ρ

36] недвусмысленно указывает на довольно жесткую связь между этими внутримолекулярными движениями, так что равновесие в растворе включает лишь ограниченное число конформеров.

Причиной подобной корреляции является наличие в молекуле нуклеозида ряда противоборствующих пространственных взаимодействий.

1. Если ограничиться рассмотрением лишь фрагмента $C1'$ —нуклеиновое основание, то более стабильной следует считать *син*-конформацию (H—H-заслонение).

2. Пространственное отталкивание *цис*-вицинальных оксигрупп в рибофуранозе разбивает путь псевдовращения на две симметричные зоны псевдолибрации, разделенные двумя энергетическими барьерами. Причем положение барьеров и зон псевдолибрации связано соотношением $\rho_2 = \rho_1 + 180^\circ$ (рис. 2). В нашем случае зоны псевдолибрации соответствуют фазовым углам, близким к 0 и 180° (конформации 3_2T и 3_2T соответственно), барьеры же — углам 90 и 270° (конформации 0E и 0E соответственно). (Значения фазового угла псевдовращения ρ и обозначения конформаций даны в соответствии с работой [26].)

3. 1,3-Отталкивание экзоциклических заместителей (нуклеиновое основание и оксиметильная группа) приводит к появлению на пути псевдовращения одного барьера при $\rho = 270^\circ$ (обе группы на аксиальных связях) и одной зоны псевдолибрации при $\rho = 90^\circ$ (оба заместителя на экваториальных связях). Поскольку вицинальное взаимодействие сильнее, 1,3-отталкивание лишь искажает симметрию, сдвигая зоны псевдолибрации ближе к $\rho = 90^\circ$ (средние значения $\rho = \sim 10$ и $\sim 160^\circ$ [26]), уменьшая барьер при $\rho = 90^\circ$ и увеличивая при $\rho = 270^\circ$. Экваториальную позицию занимает лишь один из экзоциклических заместителей, что выравнивает энергии *син*- и *анти*-конформеров в случае пуриновых нуклеозидов [27—29, 37], а в случае пиримидиновых нуклеозидов делает *анти*-конформацию более выгодной энергетически [12, 27, 28, 38—41]. Естественно, уменьшение вицинального взаимодействия ($2'$ -дезоксинуклеозиды) или замыкание $2',3'$ -оксигруппы в пятичленный цикл (изопропилиденовые производные, циклофосфаты) должно еще сильнее сдвигать зоны псевдолибрации фуранозы к $\rho = 90^\circ$ и приводить к увеличению *син*-популяции в равновесной смеси, что и отмечается в работах [12, 30, 42, 43]. Неудивительно, что только для $2'$ -дезоксинуклеозидов наблюдается в кристалле O' -*эндо*-конформация ($\rho = 90^\circ$) фуранозного цикла [44, 45].

Приведенная качественная концепция нашла экспериментальное подтверждение в ряде недавних работ [46—48], в которых с использованием величин вицинальных констант спин-спинового взаимодействия, ядерного эффекта Оверхаузера и времен спин-решеточной релаксации показана корреляция между *S*- и *син*-конформерами, с одной стороны, и *N*- и *анти*-конформерами — с другой.

В случае трис(оксиметильных) аналогов (Ia — г) расщепление связи $C2'—C3'$ приводит к полному снятию вицинального отталкивания. Есте-

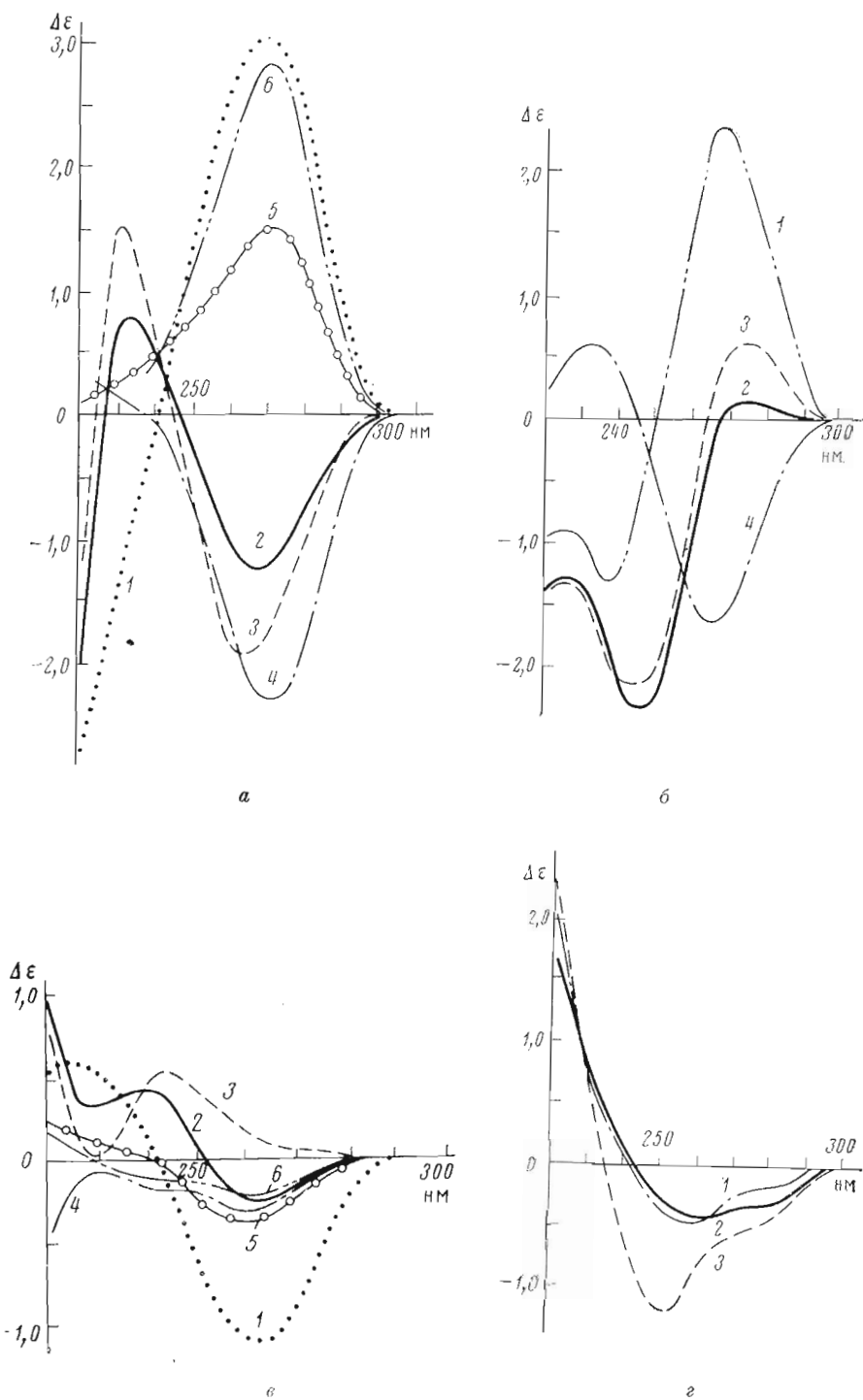


Рис. 3. Спектры КД при рН 7. а: 1 — Cyd; 2 — (Ia); 3 — (IIa); 4 — (IIIa); 5 — (IVa); 6 — (Va); б: 1 — Urd; 2 — (Iб); 3 — (IIб); 4 — (IIIб); в: 1 — Ado; 2 — (Iв); 3 — (IIв); 4 — (IIIв); 5 — (IVв); 6 — (Vв); г: 1 — Guo; 2 — (Iг); 3 — (IIг)

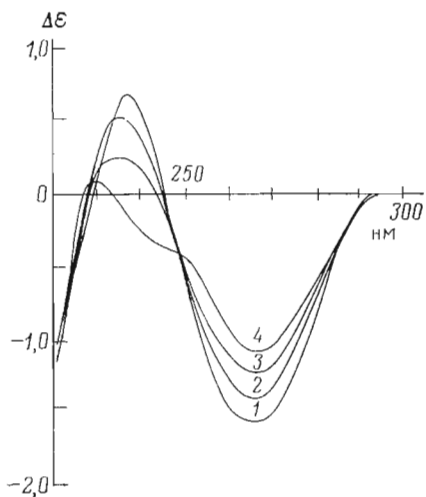


Рис. 4

Рис. 4. Спектры КД фосфата (IIa) в смеси вода — этанол при содержании этанола: 1 — 0; 2 — 40; 3 — 60; 4 — 80%

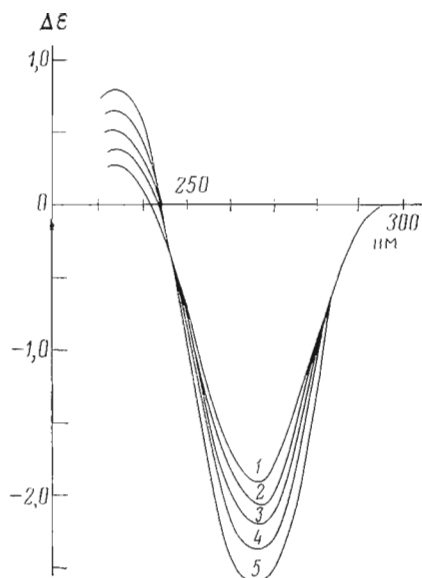


Рис. 5

Рис. 5. Спектры КД аналога уридина (IIIб) в смеси вода — метанол при содержании метанола: 1 — 0; 2 — 20; 3 — 40; 4 — 60; 5 — 80%

ственно ожидать, что конформационное равновесие при этом резко сдвинется в сторону *син*-подобной конформации.

Учитывая, что пиримидиновые нуклеозиды существуют в водных растворах преимущественно в *анти*-конформации, а также то, что хиральность при $C1'$ является причиной положительного КЭ перехода B_{211} в случае *анти*- и отрицательного КЭ в случае *син*-конформации [3, 13], разумно было предположить в случае трис(оксиметильных) аналогов пиримидиновых нуклеозидов (Ia и Ib) резкое, вплоть до обращения знака, изменение спектров КД. Действительно, КД аналога (Ia) характеризуется отрицательным КЭ в полосе B_{211} и положительным в полосе E_{111} ; B_{111} -переход проявляется лишь как перегиб спектральной кривой (рис. 3а). Дополнительным доводом в пользу высказанной точки зрения могла бы служить зависимость спектров КД изученных соединений от полярности растворителя. В самом деле, поскольку мы имеем дело с гидроксилсодержащими растворителями, успешно конкурирующими в образовании водородных связей, можно ожидать, что понижение полярности растворителя вызовет сдвиг конформационного равновесия в сторону менее полярной конформации. В разбираемом случае менее полярной является *анти*-подобная конформация, поскольку именно в ней векторы дипольного момента ациклического заместителя и гетероциклического основания противоположны по направлению. Как видно из рис. 4 и 5, увеличение концентрации спирта в водно-спиртовых смесях по-разному влияет на спектры КД соединений (IIa) и (IIIб): в первом случае наблюдается уменьшение абсолютной величины отрицательного экстремума, во втором — увеличение. Однако это кажущееся противоречие. Действительно, соединение (IIa) обладает лишь хиральным центром при $C1'$, являющимся причиной положительного КЭ в случае *анти*- и отрицательного — в случае *син*-подобной конформации. Сдвиг конформационного равновесия в сторону *анти*-подобной конформации, ожидаемый при увеличении содержания спирта в водно-спиртовых смесях, и должен, следовательно, приводить к уменьшению абсолютной величины отрицательного КЭ. С другой стороны, увеличение абсолютной

величины отрицательного КЭ перехода V_{2u} соединения (IIIб) легко объяснить, предположив, что *R*-конфигурация (рибозоподобная) при атоме $C2'$ вызывает отрицательный КЭ перехода V_{2u} *анти*- и положительный — *син*-подобной конформации. Полученные данные позволяют сделать вывод, что аналог цитидина (Iа) существует в водном растворе преимущественно в *син*-подобной конформации.

Спектр КД аналога (Iб) (рис. 3б) характеризуется резким снижением амплитуды КЭ перехода V_{2u} . Вероятно, это соединение представляет собой равновесную смесь конформеров с близкими временами жизни. Такая трактовка хорошо согласуется с экспериментально показанным уменьшением разности энергий *син*- и *анти*-конформеров при переходе от уридина к цитидину [49].

Рассмотрим теперь спектры КД разомкнутых аналогов аденозина (Iв) и гуанозина (Iг). Единственный асимметрический атом углерода этих соединений ($C1'$) имеет конфигурацию, подобную природным нуклеозидам. Однако если спектр КД аналога гуанозина (Iг) подобен спектру КД самого гуанозина (рис. 3г), то этого никак нельзя сказать об аналоге аденозина (Iв) (рис. 3в).

Экспериментально [37, 50] и теоретически [35] показано, что если аденозин существует в растворе в виде смеси конформеров с преобладанием *анти*-популяции, то при переходе к гуанозину более выгодной является *син*-конформация. Действительно, спектр КД аналога аденозина (Iв) сходен со спектром 8-бромаденозина [10], что подтверждает выдвинутую в цитируемой работе идею о том, что КЭ перехода V_{1u} более чувствителен к конформационным изменениям и *син*-конформация адениновых нуклеозидов характеризуется положительным КЭ перехода V_{1u} .

Спектр КД аналога (Iг) весьма схож со спектром гуанозина. Возможны два объяснения этому сходству: либо гуанозин в водном растворе существует полностью в виде *син*-конформера, либо разрыв фуранозного цикла не меняет соотношения *син*- и *анти*-конформеров. Первое объяснение противоречит экспериментальным данным [29, 37], поскольку преобладание в растворах гуанозина *син*-конформации является далеко не полным. Второе объяснение, в свете приведенной выше концепции, маловероятно. Этот пример еще раз показывает отмечавшиеся ранее [11] трудности и неоднозначность интерпретации спектров КД производных гуанозина.

Изученные соединения представляют интересную возможность выяснить влияние фуранозного цикла на КД нуклеозидов и проверить и уточнить схему аддитивных вкладов хиральных центров углеводного остатка в КЭ, вытекающую из теоретического рассмотрения КД нуклеозидов, проведенного Майлсом с сотр. [3].

Появление еще одного хирального центра при $C4'$ в фосфатах (IIа — г) во всех известных случаях приводит к увеличению амплитуды КЭ перехода V_{2u} . Различными методами, в частности КД [51], ДОВ [52] и ПМР [53], показано, что введение 5'-фосфатной группы в молекулу нуклеозида не меняет существенно конформационную ситуацию. Разумно поэтому предположить, что конформация фосфатов (IIа — г) мало отличается от конформации соответствующих аналогов нуклеозидов (Iа — г). Следовательно, конфигурация при $C4'$, подобная конформации в *D*-рибозе, вносит положительный вклад в КЭ *анти*-конформации и отрицательный — в КЭ *син*-конформации пиримидиновых нуклеозидов.

Поскольку теоретическая модель Майлса дает удовлетворительные результаты лишь для объяснения КД пиримидиновых нуклеозидов, мы ограничим дальнейшее обсуждение лишь аналогами цитидина и уридина.

Рассмотрение молекулярных моделей показывает, что для соединений (IIIа), (IIIб) и (Va) наиболее стабильны *анти*-подобные конформации с усредненными во времени значениями угла γ , близкими к 120° . (*S*)-Диоксипропилпроизводные цитозина (IIIа) и урацила (IIIб) позволяют, таким

образом, оценить влияние хиральности при C2' (рис. 3а и 3б). Нетрудно видеть, что R-конфигурация при C2' фуранозного цикла индуцирует отрицательный КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации пиримидиновых нуклеозидов, что согласуется с выводом, сделанным на основании изучения зависимости спектров КД от полярности растворителя. Эти данные еще раз подтверждают вывод о том, что высокие амплитуды КЭ перехода V_{2u} β -D-арабинофуранозилпиримидинов объясняются в основном конфигурационными, а не конформационными причинами. Наконец, анализ спектра КД триоксипентилцитозина (Va) (рис. 3а) свидетельствует о том, что конфигурация при C3', подобная конфигурации в D-рибозе, также индуцирует отрицательный КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации нуклеозидов. Действительно, триоксипентильные аналоги пиримидиновых нуклеозидов показывают больший по абсолютной величине и противоположный по знаку КЭ перехода V_{2u} по сравнению с диоксипропильными аналогами. Учитывая их конформационную близость, можно утверждать, что появление асимметрического атома C3' с конфигурацией, противоположной природной, приводит к возрастанию положительного КЭ перехода V_{2u} , что эквивалентно утверждению, что природная конфигурация при C3' вносит отрицательный вклад в КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации пиримидиновых нуклеозидов. Полученные данные хорошо согласуются с теоретическим предсказанием Майлса и соотр. [3] и экспериментальными данными для изомерных нуклеозидов [3, 5, 6, 54].

Кроме того, можно утверждать, что в теоретической модели неоправданно больше значение придается собственно фуранозному циклу. Этот вывод дополнительно подтверждается рассмотрением спектров КД циклических аналогов (IVa, рис. 3а). Замыкание фуранозного цикла не меняет в основных чертах спектров КД, однако наблюдается значительное уменьшение амплитуды КЭ. Очевидно, что конформация фуранозного цикла не оказывает принципиального влияния на КД нуклеозидов. Такое же уменьшение амплитуды КЭ наблюдается и при переходе от соединений (IIIa) и (IIIб) к их 2',3'-O-изопропилиденным производным. Анализ пространственных взаимодействий показывает, что замыкание пятичленного цикла не меняет существенно конформационной ситуации и, следовательно, уменьшение амплитуды КЭ связано с изменением электронной конфигурации хирального остатка.

Таким образом, снижение амплитуды КЭ в случае таких бициклических производных нуклеотидов, как 2',3'-O-изопропилиденные производные и 2',3'-циклофосфаты, связано не только со смещением конформационного равновесия в сторону *син*-популяции, но и в равной мере с изменением электронной конфигурации сахарного остатка, возможно, за счет отталкивания свободных электронных пар 2'- и 3'-атомов кислорода в заслоненной конформации.

Указанное уменьшение $\Delta\epsilon$ не может быть отнесено на счет изменения конформации фуранозного цикла, поскольку оно наблюдается и в случае ациклических соединений.

Кроме того, приведенные данные с очевидностью указывают на то, что конформация фуранозного цикла не оказывает существенного влияния на КД нуклеозидов.

Полученные данные удобно суммировать в виде аддитивной схемы, качественно описывающей вклад хиральности при отдельных атомах углерода фуранозного цикла в КЭ перехода V_{2u} пиримидиновых нуклеозидов (рассматривается D-рибо-конфигурация; вклад C1'-атома принят за 1)

| Атом | C1' | C2' | C3' | C4' |
|---|-----|------|-------|------|
| Вклад в КЭ перехода V_{2u} <i>анти</i> -конформации * | +1 | -0,5 | -0,25 | +0,1 |

* В случае *син*-конформации знаки вкладов меняются на обратные.

образом, оценить влияние хиральности при C2' (рис. 3а и 3б). Нетрудно видеть, что *R*-конфигурация при C2' фуранозного цикла индуцирует отрицательный КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации пиримидиновых нуклеозидов, что согласуется с выводом, сделанным на основании изучения зависимости спектров КД от полярности растворителя. Эти данные еще раз подтверждают вывод о том, что высокие амплитуды КЭ перехода V_{2u} β -*D*-арабинофуранозилпиримидинов объясняются в основном конфигурационными, а не конформационными причинами. Наконец, анализ спектра КД триоксипентилцитозина (Va) (рис. 3а) свидетельствует о том, что конфигурация при C3', подобная конфигурации в *D*-рибозе, также индуцирует отрицательный КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации нуклеозидов. Действительно, триоксипентильные аналоги пиримидиновых нуклеозидов показывают больший по абсолютной величине и противоположный по знаку КЭ перехода V_{2u} по сравнению с диоксипропильными аналогами. Учитывая их конформационную близость, можно утверждать, что появление асимметрического атома C3' с конфигурацией, противоположной природной, приводит к возрастанию положительного КЭ перехода V_{2u} , что эквивалентно утверждению, что природная конфигурация при C3' вносит отрицательный вклад в КЭ перехода V_{2u} *анти*-конформации пиримидиновых нуклеозидов. Полученные данные хорошо согласуются с теоретическим предсказанием Майлса и соотр. [3] и экспериментальными данными для изомерных нуклеозидов [3, 5, 6, 54].

Кроме того, можно утверждать, что в теоретической модели неоправданно большое значение придается собственно фуранозному циклу. Этот вывод дополнительно подтверждается рассмотрением спектров КД циклических аналогов (IVa, рис. 3а). Замыкание фуранозного цикла не меняет в основных чертах спектров КД, однако наблюдается значительное уменьшение амплитуды КЭ. Очевидно, что конформация фуранозного цикла не оказывает принципиального влияния на КД нуклеозидов. Такое же уменьшение амплитуды КЭ наблюдается и при переходе от соединений (IIIa) и (IIIб) к их 2',3'-*O*-изопропилиденным производным. Анализ пространственных взаимодействий показывает, что замыкание пятичленного цикла не меняет существенно конформационной ситуации и, следовательно, уменьшение амплитуды КЭ связано с изменением электронной конфигурации хирального остатка.

Таким образом, снижение амплитуды КЭ в случае таких бициклических производных нуклеотидов, как 2',3'-*O*-изопропилиденные производные и 2',3'-циклофосфаты, связано не только со смещением конформационного равновесия в сторону *син*-популяции, но и в равной мере с изменением электронной конфигурации сахарного остатка, возможно, за счет отталкивания свободных электронных пар 2'- и 3'-атомов кислорода в заслоненной конформации.

Указанное уменьшение $\Delta\epsilon$ не может быть отнесено на счет изменения конформации фуранозного цикла, поскольку оно наблюдается и в случае ациклических соединений.

Кроме того, приведенные данные с очевидностью указывают на то, что конформация фуранозного цикла не оказывает существенного влияния на КД нуклеозидов.

Полученные данные удобно суммировать в виде аддитивной схемы, качественно описывающей вклад хиральности при отдельных атомах углерода фуранозного цикла в КЭ перехода V_{2u} пиримидиновых нуклеозидов (рассматривается *D*-рибо-конфигурация; вклад C1'-атома принят за 1)

| Атом | C1' | C2' | C3' | C4' |
|---|-----|------|-------|------|
| Вклад в КЭ перехода V_{2u} <i>анти</i> -конформации * | +1 | -0,5 | -0,25 | +0,1 |

* В случае *син*-конформации знаки вкладов меняются на обратные.

повторяли эту операцию еще раз и остаток оставляли на ночь в 100 мл полунасыщенного при 0° раствора аммиака в метаноле. Реакционную смесь упаривали в вакууме, растворяли в 20 мл спирта, упаривали, повторяли эту операцию еще раз и затем двукратно упаривали с 20 мл этилацетата и перекристаллизовывали из спирта. Выходы полученных соединений приведены в табл. 1.

Метод Б. К раствору 10 ммоль натриевой соли нуклеотида в 45 мл воды при перемешивании за 20 мин добавляли 2,45 г периодата натрия, реакционную массу оставляли на 12 ч при 0°, фильтровали, промывали водой, к фильтрату прибавляли 5,87 г (26,3 ммоль) ацетата бария, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (3 × 50 мл), к фильтрату за 30 мин прибавляли при перемешивании 2 г (52 ммоль) боргидрида натрия и перемешивали 2 ч при 20°. Раствор нейтрализовали уксусной кислотой (1 : 3), наносили на колонку с дауэксом-50 (H⁺-форма, 180 мл), промывали водой и элюировали 2,5% водным аммиаком. Аммиачный раствор упаривали в вакууме, упаривали с водой (3 × 50 мл), растворяли в 100 мл воды, раствор наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, 500 мл) и элюировали NH₄HCO₃ (линейный градиент 0,05 → → 0,2 М NH₄HCO₃, объем 9 л). Фракции, содержащие аналог (элюирующая концентрация NH₄HCO₃ 0,12 М, контроль по УФ-поглощению при 260 нм), объединяли, упаривали в вакууме досуха, растворяли в 20 мл воды, упаривали и эту операцию повторяли еще 4 раза. Остаток растворяли в 50 мл воды и диофилизовали. Выходы аналогов (II) приведены в табл. 1. Полученные вещества хроматографически и электрофоретически гомогенны. Строение полученных соединений однозначно доказывают их спектры ПМР (табл. 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Miles D. W., Robins M. J., Robins N. K., Eyring H. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 22—29.
2. Miles D. W., Townsend N. B., Robins M. J., Robins N. K., Inskeep W. H., Eyring H. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 93, 1600—1608.
3. Miles D. W., Inskeep W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3872—3881.
4. Inskeep W. H., Miles D. W., Eyring H. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3866—3872.
5. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 831—838.
6. Nishimura T., Shimizu B., Iwai I. (1968) Biochim. et biophys. acta, 157, 221—232.
7. Holý A., Rogers G. T., Ulbricht T. L. V. (1970) FEBS Lett., 7, 335—336.
8. Rogers G. T., Ulbricht T. L. V. (1970) FEBS Lett., 7, 337—338.
9. Rogers G. T., Ulbricht T. L. V. (1971) Eur. J. Biochem., 22, 457—466.
10. Delabar J. M., Guschlbauer W. (1972) Biochimie, 54, 1041—1048.
11. Delabar J. M., Guschlbauer W. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 5729—5735.
12. Rabczenko A., Jankowski K., Zakrzewska K. (1974) Biochim. et biophys. acta, 353, 1—15.
13. Inskeep W. H., Miles D. W., Eyring H. (1972) J. Chem. Phys., 57, 2736—2744.
14. Teng N. N. H., Itzkowitz M. S., Tinoco I. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 92, 6257—6264.
15. Studdert D. S., Davis R. C. (1974) Biopolymers, 13, 1405—1406.
16. Voelter W., Records R., Bunnenberg E., Djerassi C. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 6163—6170.
17. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2300—2301.
18. Mikhailov S. N., Kolobushkina L. I., Kritzyn A. M., Florentiev V. L. (1976) Tetrahedron, in press.
19. Lerner L. M. (1970) Carbohydr. Res., 13, 465—468.
20. Khym J. X. (1963) Biochemistry, 2, 344—349.
21. Jones A. S., Walker R. T. (1973) Carbohydr. Res., 26, 255—261.
22. Buist G. J., Bunton C. A., Lomas J. (1966) J. Chem. Soc. B, 1094—1097.
23. Clark L. B., Tinoco I. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 11—16.
24. Clark L. B., Peschel G. G., Tinoco I. (1965) J. Chem. Phys., 17, 484—489.
25. Altona C., Sundaralingam M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2333—2344.
26. Altona C., Sundaralingam M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 8205—8212.
27. Pitha J., Chaladek S., Smrt J. (1963) Collect. Czech. Chem. Commun., 28, 1622—1624.

28. Pitha J. (1970) *Biochemistry*, **9**, 3678—3682.
29. Son Tran Dinh, Guschlbauer W., Gueron M. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 7903—7911.
30. Kulakowska I., Rabczenko A. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **361**, 131—139.
31. Rhodes L. M., Schimmel P. R. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4426—4439.
32. Jochin J. C., Pflleiderer W., Kobayashi K., Ritzmann G., Hutzenlaub W. (1973) *Chem. Ber.*, **106**, 2975—2981.
33. Hruska F. E., Smith A. A., Dalton J. G. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 4334—4340.
34. Wood D. J., Mynott R. J., Hruska F. E., Sarma R. H. (1973) *FEBS Lett.*, **34**, 323—326.
35. Yathindra N., Sundaralingam M. (1973) *Biopolymers*, **12**, 297—314.
36. Saran A., Perahia D., Pullman B. (1973) *Theoret. chim. acta*, **30**, 31—44.
37. Gueron M., Chachaty C., Son Tran Dinh (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 307—323.
38. Schweizer M. P., Witkowsky J. T., Robins R. K. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 277—281.
39. Hruska F. E. (1971) *Can. J. Chem.*, **49**, 2114—2122.
40. Blackburn B. J., Gray A. A., Smith I. C. P., Hruska F. E. (1970) *Can. J. Chem.*, **48**, 2866—2878.
41. Dugas H., Blackburn B. J., Robins R. K., Deslauriers R., Smith I. C. P. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 3468—3473.
42. Hart P. A., Davis J. P. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 753—759.
43. Davis J. P. (1972) *Tetrahedron*, **28**, 1155—1165.
44. Konnett J., Karle I. L., Karle J. (1970) *Acta crystallogr., Sect. B.*, **26**, 770—779.
45. Seschadri T. P., Viswamitra M. A. (1974) *Pramana*, **3**, 218—235.
46. Lüdemann H.-D., Röder O., Westhof E., Goldammer E.V., Müller A. (1975) *Biophys. Struct. Mechanisms*, **1**, 121—137.
47. Lüdemann H. D., Westhof E., Röder O. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **49**, 143—150.
48. Westhof E., Röder O., Croneiss I., Lüdemann H.-D. (1975) *Z. Naturforsch.*, **30c**, 131—140.
49. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 749—756.
50. Föllmann H., Gromels G. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **47**, 187—197.
51. Ikehara M., Vesugi S., Yoshida K. (1972) *Biochemistry*, **11**, 830—836.
52. Yang J. T., Samejima T., Sarkar P. K. (1966) *Biopolymers*, **4**, 623—636.
53. Davis D. B., Danyluk S. S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4417—4434.
54. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V. (1967) *Biochemistry*, **6**, 843—850.
55. Ulbricht T. L. V., Jennings J. P., Scopes P.M., Klyne W. (1964) *Tetrahedron Lett.*, 695—698.
56. Nishimura T., Shimizu B., Iwai I. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **157**, 221—232.
57. Ingwall J. S. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 5487—5495.

Поступила в редакцию
6.I.1976

После переработки
12.III.1976

NON-GLYCOSIDIC NUCLEOTIDE ANALOGS. XI. CIRCULAR DICHROISM OF HYDROXYALKYL DERIVATIVES OF NUCLEIC BASES

KRITZYN A. M., MIKHAILOV S. N., MISHARIN A. Yu.,
PADYUKOVA N. Sh., FLORENTIEV V. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The synthesis of tris(hydroxymethyl) nucleotide and nucleoside analogs has been accomplished. The circular dichroism (CD) data are presented for 17 hydroxyalkyl derivatives of nucleic bases. The additive scheme is proposed which takes into account the configurational contributions of nucleosides into CD spectra, and is based on the Cotton effect dependence on the chirality of substituents at the pentafuranose ring. The relation between conformation of the latter and nucleoside CD spectra is discussed.