



УДК 547.963.32.07

НЕИОННЫЕ АНАЛОГИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

СИНТЕЗ АЛКИЛОВЫХ ТРИЭФИРОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ РЕАКЦИЕЙ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ

*Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф.,
Шубина Т. Н.*

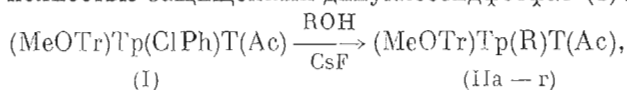
*Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ
Главмикробиопрома при Совете Министров СССР, Новосибирск*

Синтезированы этиловые триэфирные аналоги ди-, три-, гекса- и нонатимидилатов переэтерификацией хлорфениловых производных олигонуклеотидов в присутствии CsF. Показано, что замещение хлорфенильного остатка на алкыл протекает количественно за 30–40 мин при 20°С. Не обнаружено существенного различия в реакционной способности метанола, этанола, изопропанола и 1,2-О-изопропилиден-глицерина в реакции переэтерификации. Структура алкиловых триэфирных аналогов олиготимидилатов подтверждена данными ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

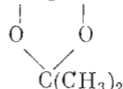
Синтетические аналоги олигонуклеотидов, отличающиеся липофильными свойствами, устойчивостью к нуклеазам и способностью специфически связываться с нуклеиновыми кислотами, представляют значительный интерес для молекулярно-биологических исследований [1, 2]. Таким требованиям могут отвечать, например, триэфирные производные олигонуклеотидов, содержащие алкильные заместители при атомах фосфора [3]. Существующие методы получения таких аналогов весьма сложны и трудоемки [4], что создает значительные препятствия для их всестороннего исследования.

Целью настоящей работы является синтез фосфотриэфирных аналогов олигонуклеотидов исходя из полностью защищенных производных, содержащих хлорфенильные заместители при атомах фосфора. Последние получают с помощью хорошо зарекомендовавшего себя триэфирного метода синтеза олигонуклеотидов [5].

Недавно обнаружено, что некоторые анионы, например фтор, могут служить эффективными катализаторами при замещении арильного остатка средних фосфатов на алкильный [6, 7]. Нами проведено исследование возможностей переэтерификации для получения триэфирных аналогов олигонуклеотидов на примере ди-, три-, гекса- и нонатимидилатов *. В качестве модельного соединения для изучения реакции алкоголиза был использован полностью защищенный динуклеозидфосфат (I):

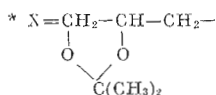


где а) R=Et; б) R=Me; в) R=Prⁱ; г) R=CH₂-CH-CH₂-



* Символ «d» в схемах и таблице опущен.

Соединение	$R_{T(Ac)}$ до обработки NH_3 в системе			$R_{T(Ac)}$ после обработки NH_3 в системе	
	А	Б	В	А	В
(MeOTr) Tr (ClPh) T (Ac)	1,9	1,1		0	
(MeOTr) Tr (Me) T (Ac)		0,6			
(MeOTr) Tr (Et) T (Ac)	1,7	0,8		0,7	
(MeOTr) Tr (iPr) T (Ac)	1,7	0,9			
(MeOTr) Tr (X *) T (Ac)	1,4	0,7		0,8	
[(MeO) ₂ Tr] Tr (ClPh) Tr (ClPh) T (Ac)	1,2	1,1		0	
[(MeO) ₂ Tr] Tr (Et) Tr (Et) T (Ac)	1,0	0,7		0,4	
[(MeO) ₂ Tr] Tr (ClPh) [Tr (ClPh)] ₄ T (Ac)			1,3		0
[(MeO) ₂ Tr] Tr (Et) [Tr (Et)] ₄ T (Ac)			1,1		0,9
[Tr (Et)] ₅ T			0,7		0,7
[(MeO) ₂ Tr] Tr (ClPh) [Tr (ClPh)] ₇ T (Ac)			1,2		0
[(MeO) ₂ Tr] Tr (Et) [Tr (Et)] ₇ T (Ac)			0,6		0,55
[Tr (Et)] ₈ T			0,4		0,4



Реакцию переэтерификации проводили в соответствующем спирте (метанол, этанол, изопропанол, 1,2-изопропилиденглицерин) в присутствии CsF, взятого в 10–15-кратном мольном избытке по отношению к фосфотриэфиру (I). За превращением следили с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии и ТСХ. В спектрах, снятых в условиях подавления гетероядерного расщепления, наблюдалось исчезновение сигналов хлорфенильного производного (I) и появление сигналов, принадлежащих эписмерам (II) (рис. 1, таблица). По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, переэтерификация проходит количественно за 30–40 мин при 20°С. Огильви с сотрудниками в кратком сообщении [6] отметили, что превращение фенильных производных средних фосфатов в алкильные проходит в подобных условиях за 8 ч. Таким образом, использование более электроноакцепторного хлорфенильного заместителя при фосфате позволяет в 15–20 раз сократить время реакции. Нами не обнаружено различий в реакционной способности первичных и вторичных спиртов.

Соединения (II а–г) выделены с выходом 80–90% экстракцией из воды в хлороформ или адсорбционной хроматографией на силикагеле. Структуру полученных соединений подтверждали комплексом использованных нами методов. Так, положение сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР указывает на принадлежность производных к средним фосфатам, а их структура соответствует смеси двух диастереоизомеров. Увеличение электронодонорных свойств алкильных заместителей приводит к характерному сдвигу сигналов в сильное поле. О присутствии в целевых продуктах двух остатков тимидина можно судить по наличию в спектрах ПМР характерных сигналов, принадлежащих 3'-О-ацетилю (2,1 с, 3H) и 5'-метокситриетилю группам (3,8 с, 3H; 7,2 м, 14H). По данным ТСХ на силикагеле (см. таблицу), полученные производные не заряжены, причем с увеличением липофильности алкильных заместителей заметно повышается хроматографическая подвижность триэфиров.

Устойчивость полученных фосфотриэфиров к водному аммиаку также свидетельствует о присутствии алкильных заместителей при атоме фосфо-

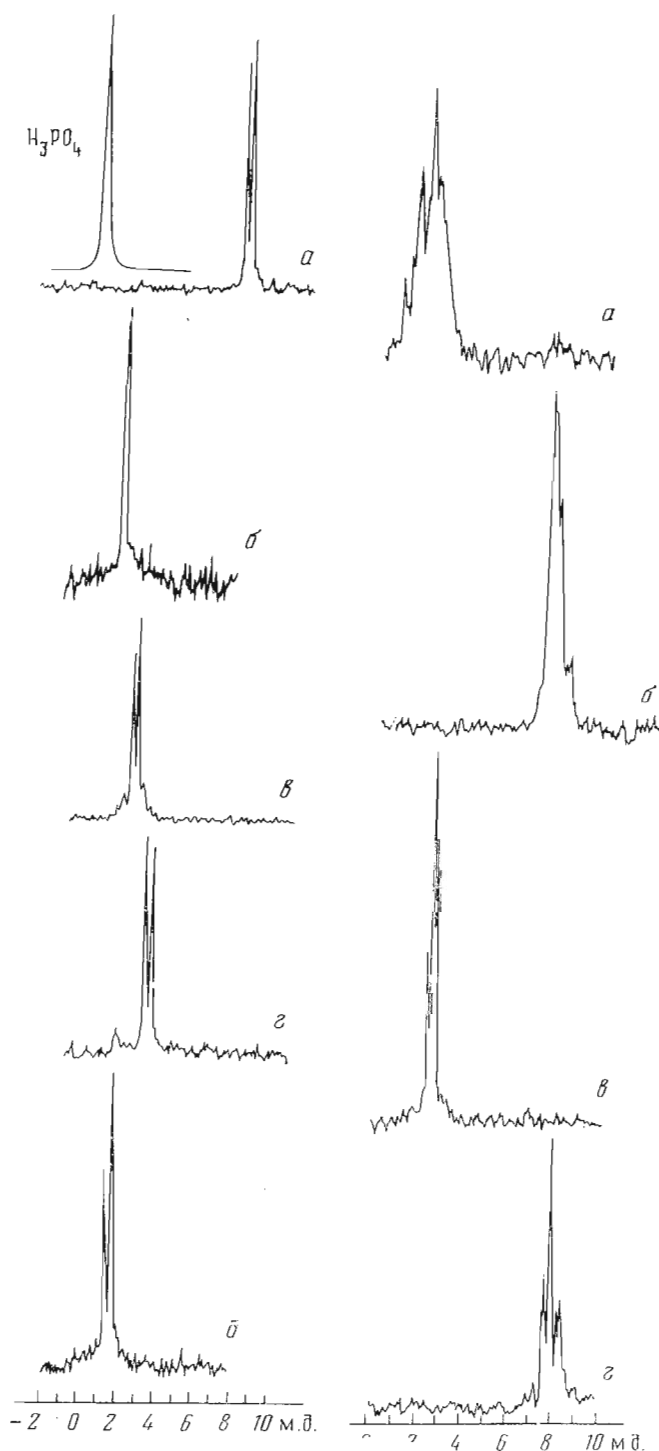


Рис. 1

Рис. 2

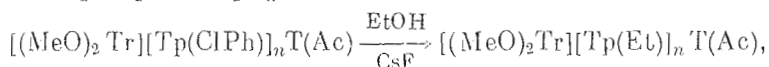
Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР хлорфенилового защищенного производного тимидилил-3',5'-тимидина $(MeOTr)Tr(ClPh)T(AC)$ (a) и продуктов его взаимодействия с метанолом (б), этанолом (в), изопропанолом (г) и 1,2-O-изопропилиденглицерином (д)

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР хлорфениловых защищенных производных гексатимидилата $[(MeO)_2Tr]Tr(ClPh)[Tr(ClPh)]_4T(AC)$ (б) и тритимидилата $[(MeO)_2Tr]Tr(ClPh) \cdot Tr(ClPh)T(AC)$ (г) и продуктов их взаимодействия с этанолом — a и в соответственно

ра. Как видно из таблицы, продукты взаимодействия соединений (II а—г) с аммиаком лишь незначительно отличаются по хроматографической подвижности от исходных, что связано с отщеплением 3'-О-ацетильной группы. Хлорфенильное производное (I) в тех же условиях превращается в заряженный динуклеозидмонофосфат (MeOTr)TrT. Такой простой анализ позволяет судить о полноте переэтерификации и в случае менее доступных исходных олигонуклеотидов, когда затруднено ЯМР-спектроскопическое исследование реакции.

После отработки условий алкоголиза защищенного динуклеозидмонофосфата мы исследовали эту реакцию в ряду более длинных олигонуклеотидов: три-, гекса- и нонатимидилатов. В качестве спирта использовали этанол. Алкоголиз хлорфенильных производных олиготимидилатов приводил к образованию этиловых триэфиров олигонуклеотидов. За реакцией следили с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии (рис. 2), а также ТСХ на силикагеле. Как и в случае модельного соединения (I), превращение протекало количественно за 30–40 мин при 20°С. Это указывает на независимое поведение отдельных межнуклеотидных триэфирных фосфатных групп в реакции переэтерификации.

Следует отметить, что в случае длинных олигонуклеотидов увеличивается вероятность отщепления хлорфенильных групп вследствие гидролиза. Эту реакцию удастся свести к минимуму при тщательном высушивании компонентов реакционной смеси. В то же время такие побочно образующиеся при алкоголизе соединения отрицательно заряжены и легко отделяются при хроматографии:



где $n = 2, 5, 8$.

После удаления в стандартных условиях концевых защитных групп этильные производные олигонуклеотидов выделяли препаративной ТСХ на силикагеле. Синтезированные соединения не заряжены, на что указывают их хроматографические характеристики. Наблюдается также закономерное снижение хроматографической подвижности с удлинением олигонуклеотидной цепи.

Разработанный метод синтеза алкильных производных олиготимидилатов, по-видимому, может быть распространен на любые олигонуклеотиды со специфической последовательностью оснований. В настоящее время нами исследуются возможности использования в реакции переэтерификации разнообразных спиртов, в том числе содержащих дополнительные функциональные группы.

Авторы признательны С. Ф. Бычкову за записи спектров ЯМР и В. В. Самукову за участие в обсуждении работы.

Экспериментальная часть

Полностью защищенные олиготимидилаты синтезированы триэфирным методом [5] и после деблокирования охарактеризованы микроколопной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентраций NaCl в 0,01 М трис-HCl-буфере, содержащем 7 М мочевины (pH 7,5). Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на спектрометре WP-80 (Bruker-Physic AG, ФРГ) на частоте 32, 40 МГц. Химические сдвиги приведены относительно внешнего стандарта H_3PO_4 . ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах: $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 9,5 : 0,5 (А); $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$, 9 : 1 (Б); $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 8 : 2 (В).

Общая методика синтеза Р-замещенных аналогов ди- и тритимидилатов. К раствору 0,1 ммоль полностью защищенного олиготимидилата в 1,2 мл безводного спирта добавляли CsF (10–15-кратный избыток на каждый межнуклеотидный фосфат) и оставляли смесь при 20°С на 40 мин.

Раствор упаривали, остаток растворяли в хлороформе (15 мл), промывали водой (3 мл $\times$ 10). Органический слой концентрировали в вакууме. Дополнительную очистку соединений осуществляли с помощью хроматографии на силикагеле. Выход 80–90%.

Общая методика синтеза этиловых эфиров гекса- и нонатимидилатов. К раствору 10 мкмоль олигонуклеотида в 2,0 мл смеси хлороформ — этанол (1 : 1) добавляли CsF в 10-кратном избытке в расчете на каждый ме-
нуклеотидный фосфат. Через 40 мин реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 3 мл хлороформа и промывали водой (1 мл $\times$ 10). Хлороформный слой упаривали. После удаления концевых защитных групп целевые продукты выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле в системе хлороформ — метанол (8,5 : 1,5). Выход 20–25%. Характеристики синтезированных олигонуклеотидов приведены в таблице.

Методика удаления концевых защитных групп. Раствор 1 мкмоль полностью защищенного олигонуклеотида в 3 мл смеси пиридин — конц. аммиак (1:15) выдерживали 2 ч при 50°C. Раствор упаривали, остаток растворяли в 1 мл 80% уксусной кислоты, выдерживали 1 ч при 20°C и упаривали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1988–1996.
2. Zamecnik P. C., Stephenson M. L. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 280–284.
3. Pless R. C., Ts'o P. O. P. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1239–1250.
4. Miller P. S., Barret J. C., Ts'o P. O. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4887–4896.
5. Stawinski J., Horumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 353–371.
6. Ogilvie K. K., Beaucage S. L., Theriault N., Entwistle D. W. (1977) *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 1277–1278.
7. Ramirez F., Marecek J. F. (1977) *Tetrahedron Lett.*, 967–970.

Поступила в редакцию
2.VII.1979

NONIONIC ANALOGS OF OLIGONUCLEOTIDES. SYNTHESIS OF ALKYL TRIESTERS OF OLIGONUCLEOTIDES BY THE TRANSESTERIFICATION REACTION

PETRENKO V. A., POZDNYAKOV P. I., SIVOLOBOVA G. F., SHUBINA T. N.

*Special Technological Bureau for Designing of Biologically
Active Compounds, Novosibirsk*

Ethyl triester analogs of di-, tri-, hexa- and nonathymidylates were synthesized by the transesterification of oligonucleotide chlorophenyl derivatives. The CsF catalyzed substitution of chlorophenyl by alkyl groups was complete within 30–40 min at 20°C. No significant difference was observed in reactivity of methanol, ethanol, isopropanol and 1,2-isopropylideneglycerol in transesterification reaction. The structure of oligonucleotides alkyl triester analogs was confirmed by the TLG and NMR spectroscopy.