



УДК 547.963.32.07/088.8

ТИОФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

I. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МОНОМЕРОВ ДЛЯ СИНТЕЗА 5'-S-ТИОФОСФАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф.,
Баранова Л. В.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

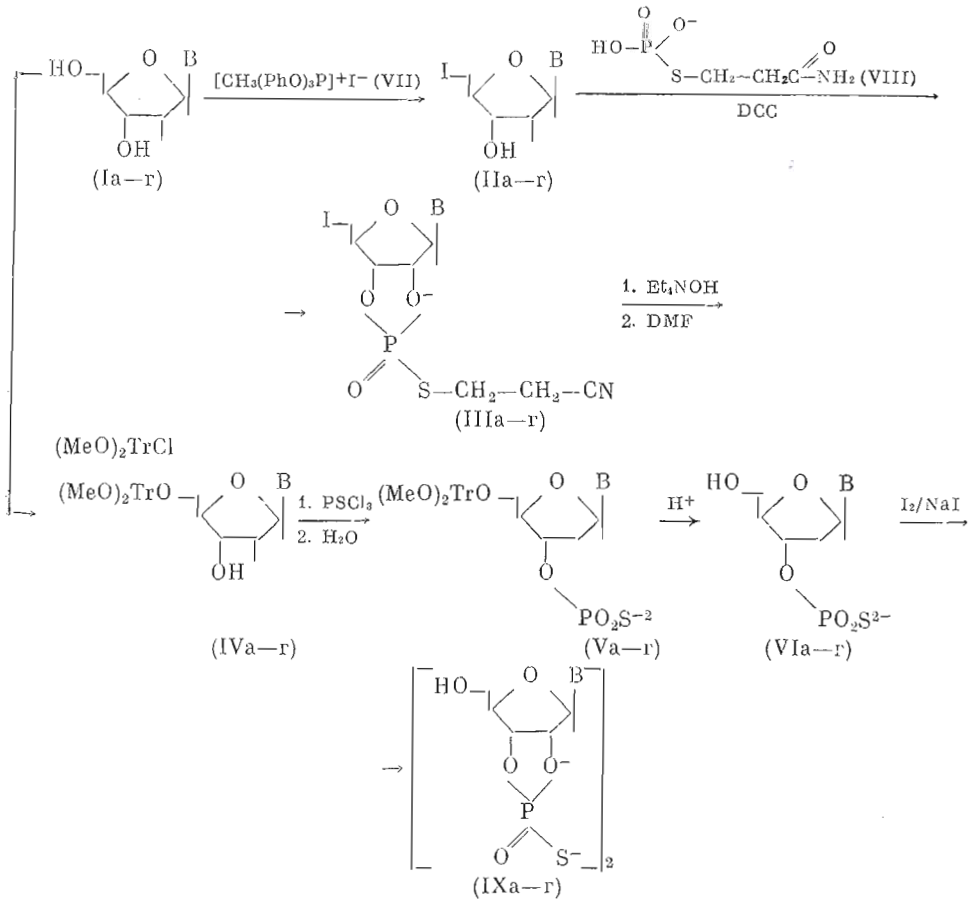
Получены новые высокоактивные мономеры для синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов: N⁴-анизол-2',5'-дидезокси-5'-подцитидин, N⁶-бензоил-2',5'-дидезокси-5'-подаденозин и 2',5'-дидезокси-N²-изобутирил-5'-подгуанозин — иодированием N-защищенных дезоксирибонуклеозидов метилтрифеноксифосфоний-йодидом в DMF; 2',5'-дидезокси-5'-поднуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил) тиофосфаты — фосфорилированием соответствующих N-защищенных 2',5'-дидезокси-5'-поднуклеозидов S-β-карбамоилэтилтиофосфатом в присутствии DCC в смеси гексаметапол — пиридин; N⁶-бензоил-2'-дезоксиаденозин-3'-O-тиофосфат и 2'-дезокси-N²-изобутирилгуанозин-3'-O-тиофосфат — тиофосфорилированием соответствующих N-защищенных 5'-O-диметокситритилдезоксирибонуклеозидов тиофосфорилхлоридом в пиридине. Изучены реакции нуклеофильного замещения иода в иодсодержащих производных синтезированных тиофосфатами, а также 5'-сульфонилкислотные группы в 5'-O-тозил- и 5'-O-мезил-тимидине и галогена в первичных галоидалкилах тимидин-3'-O-тиофосфатом в DMF. Иодометрическим методом определены константы скорости изученных реакций и показано, что их кинетика подчиняется уравнению первого порядка. Найдено, что реакционная способность 2',5'-дидезокси-5'-подтимидина в этих реакциях на два порядка больше, чем у соответствующих тозилного и мезильного производных.

5'-S-Тиофосфатные производные являются одной из наиболее интересных групп аналогов нуклеиновых кислот [1—5]. Замена O5'-атома на атом серы, произведенная в таких соединениях, вносит лишь минимальные структурные изменения, приводя вместе с тем к появлению новых химических и биохимических свойств. Так, они имеют вторичную структуру, близкую к структуре природных соединений, образуют комплементарные комплексы с природными полинуклеотидами [2, 3], но с трудом гидролизуются ферментами [3, 5, 6] и легко расщепляются при окислении [3]. Такие производные могут быть удобными инструментами при изучении ферментов метаболизма нуклеиновых кислот или заменителями природных олигонуклеотидов в некоторых случаях [6, 7].

Несмотря на то, что со времени синтеза первых представителей соединений этого класса прошло уже много времени [1, 2, 5], они продолжают оставаться труднодоступными. Это обстоятельство сдерживает исследования в данной области. Основная причина — отсутствие достаточно эффективных мономеров для синтеза таких аналогов, так как предложенные для этой цели 5'-O-тозилнуклеозид-3'-O-(O-β-цианэтил) тиофосфаты или 5'-O-тозилнуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил) тиофосфаты [2—4] (особенно пуриновые производные [3]) оказались малореакционноспособными в реакциях замещения с нуклеозид-3'-O-тиофосфатами в DMF. Одной из причин этого авторы считают невыгодность *n*-толилсульфонилкислотных групп в качестве уходящей из-за взаимодействия ее с ароматическими системами оснований и электростатического отталкивания аниона нуклеофила [4]. Кук для тех же целей применял 5'-иодтимидин [5], но оценить предпочтительность иодидов по сравнению с тозилатами было затруднительно из-за несопоставимости условий реакций в работах [3] и [5] и отсутствия точных кинетических данных. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе полного

В работе использовались следующие сокращения: DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид, (MeO)₂Tg — диметокситритил, (Ms)dT — 5'-O-мезилтимидин, DMF — N,N'-диметилформамид, HMPG — гексаметилфосфотриамид (гексаметапол).

Схема 1

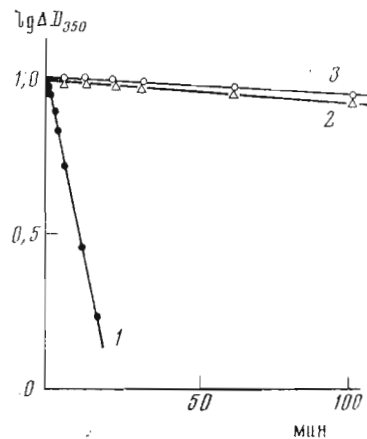


а) B=Thy, б) B=4AnCyt, в) B=6BzAde, г) B=2IbuGua

набора высокореакционноспособных мономеров для получения 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, включающего 3'-O-тиофосфатные аналоги нуклеотидов (VIa-r) и алкилирующие (IIa-r) и (IIIa-r) производные (схема 1).

В связи с вышесказанным исходным моментом данной работы послужил выбор замещающей группы при C5'-атомах мономеров (IIa-r) и (IIIa-r). Для этого было проведено сравнение констант скоростей реакций тимидин-3'-O-тиофосфата (VIa) с 5'-дезоксид-5'-иод-, 5'-O-тозил- и 5'-O-метилтимидином в DMF. Было найдено, что 5'-дезоксид-5'-иодтимидин

Зависимость константы скорости реакции алкилирования тимидин-3'-O-тиофосфата (VI) (22° С, DMF) от природы замещающей группы в алкилирующих производных тимидина: 1 - 2',5'-дидезокси-5'-иодтимидин (IIa); 2 - 5'-O-тозилтимидин; 3 - 5'-O-метилтимидин. Концентрация тимидин-3'-O-тиофосфата 0,05 М, алкилирующих производных - 0,1 М



Характеристики синтезированных соединений

Соединение	R_f в системе				E_{pT}	УФ-спектр		Отношение соединения тиофосфат — нол, моль/моль	$k_{раз} \cdot 10^{-2}$, мин ⁻¹	
	А	Б	В	Г		λ_{max} , нм (ε)	λ_{min} , нм (ε)		(VIa)	(IIa)
(Ia)	0,08	0,27	0,76	0,86		267 (9600)	235 (2200)			
(IIa)	0,42	0,65	0,86	0,89		267 (9700)	235 (2400)		13	
(IIIa)		0,08	0,65	0,82	0,46	267 (9600)	236 (2800)	1 : 0,96 : 0,96	25	
(VIa)			0,08	0,38	1,15	267 (9600)	236 (2500)	1 : 0,99		13
(IXa)			0,09	0,38	0,98	267 (9700)	236 (2800)			
(Xa)			0,43	0,66	0,62	267 (9700)	236 (2900)			
(Iб)	0,23	0,41	0,91	0,94		302 (25000)	236 (8200)			
(IIб)	0,55	0,78	0,96	0,96		302 (25000)	237 (8400)		9	
(IIIб)	0,01	0,15	0,79	0,86	0,42	302 (24500)	237 (8800)	1 : 0,97 : 0,97	22	
(VIб)			0,12	0,54	1,08	302 (24500)	238 (8700)	1 : 0,98		11
(IXб)			0,12	0,54	0,92	302 (24500)	238 (8800)			
(Xб)			0,54	0,73	0,60	302 (24500)	238 (8700)			
(Iв)	0,20	0,36	0,84	0,92		280 (20700)	242 (9700)			
(IIв)	0,51	0,73	0,89	0,94		280 (20500)	247 (11000)		4	
(IIIв)	0,51	0,12	0,70	0,85	0,38	280 (20500)	250 (11500)	1 : 0,96 : 0,96	6	
(VIв)			0,10	0,46	0,98	280 (20500)	250 (11000)	1 : 0,97		12
(IXв)			0,10	0,46	0,88	280 (20500)	252 (11600)			
(Xв)			0,51	0,70	0,53	280 (20500)	252 (11600)			
(Iг)	0,06	0,19	0,72	0,85		260 (16600)	230 (2540)			
(IIг)	0,40	0,62	0,85	0,88		260 (16700)	230 (3600)		4	
(IIIг)		0,67	0,62	0,81	0,35	260 (16700)	234 (5900)	1 : 0,98 : 0,98	5	
(VIг)			0,10	0,43	0,95	260 (16600)	232 (5700)	1 : 0,97		13
(IXг)			0,10	0,42	0,78	260 (16600)	234 (5900)			
(Xг)			0,41	0,62	0,51	260 (16700)	232 (5700)			
(Tos) dT	0,41	0,63	0,85	0,88		266 (10900)	242 (4800)		0,16	
(Ms) dT	0,22	0,45	0,72	0,86		267 (9700)	238 (3200)		0,08	
n-C ₄ H ₉ I									34	
n-C ₃ H ₇ Br									1,5	

(IIa) почти на два порядка более реакционноспособен в реакции с соединением (VIa), чем 5'-О-тозил- и 5'-О-мезилтимидин (см. рисунок и таблицу).

Синтез мономеров (IIa — г), (IIIa — г) и (VIa — г) осуществляли по схеме 1, исходя из N-защищенных дезоксирибонуклеозидов (Ia — г).

Момеры (IIa — г) получали иодированием соответствующих соединений (Ia — г) метилтрифеноксифосфониййодидом (VII) в DMF [8, 9]. Введение ацильных защитных групп в гетероциклические основания предотвращает циклизацию 5'-йодпроизводных пуриновых дезоксирибонуклеозидов в N³, 5'-циклонуклеозиды [10, 11]. Действительно, соединения (IIв, г) оказались сравнительно стабильными веществами, выдерживающими условия кристаллизации и длительной хроматографии. Структуру и гомогенность соединений (IIa — г) подтверждали данными ТСХ на силикагеле, УФ-спектров и элементного анализа.

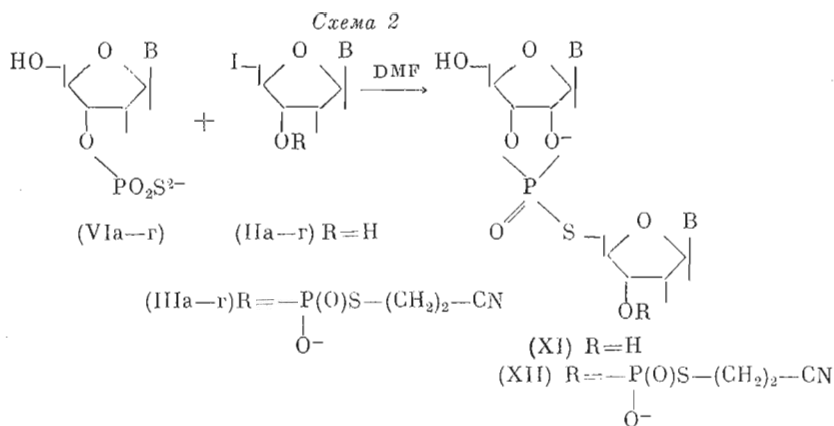
Выбирая метод синтеза мономеров (IIIa — г), мы принимали во внимание алкилирующие свойства 5'-йодпроизводных нуклеозидов, наличие которых делало нежелательным применение в качестве растворителя пиридина из-за его способности алкилироваться такими соединениями [8], а в качестве фосфорилирующего агента — тиофосфорилхлорида ввиду легкой циклизации образующихся 5'-йоднуклеозид-3'-О-тиофосфатов. Соединения (IIIa — г) получали модифицированным методом [5], обрабатывая нуклеозиды (IIa — г) четырехкратным избытком пиридиниевой соли тиофосфата (VIII) и восьмикратным избытком DCC в смеси гексаметапол — пиридин (8 : 2) (схема 1). Увеличение избытка тиофосфата (VIII) и DCC и повышение концентрации гексаметаполя в смеси по сравнению с предложенными ранее [5] привели к существенному увеличению скорости реакции и выхода продукта. Еще одним полезным следствием произведенных изменений было превращение в ходе реакции тиофосфорилирования карбамоильной группы соединения (VIII) в цианэтильную, чего

в условиях, предложенных в работе [5], не отмечалось. Вероятно, это происходит вследствие известной способности ДСС дегидратировать амиды в нитрилы [9]. Незначительные количества карбамоилэтильных производных нуклеотидов, остающиеся в реакционной смеси, отделяются от соединений (IIIa — r) при ионообменной и гель-хроматографии вследствие меньшей гидрофобности. Идентификация соединений (IIIa — r) была проведена на основании спектральных и хроматографических данных, а также путем сопоставления скорости отщепления защитной группы с тиофосфатного остатка с литературными данными и анализа продуктов циклизации (Xa — r). В ИК-спектрах соединений (IIIa — r) присутствует полоса 2200—2300 см⁻¹, характерная для CN-группы, полупериод щелочного отщепления цианэтильной защитной группы равен 4 мин в 0,5 н. LiOH при 20° С, а у соответствующих карбамоилэтильных производных — 33 мин [4, 5]. Способность производных (IIIa — r) в разбавленных растворах в DMF после щелочной обработки образовывать почти с количественным выходом 2',5'-дидезокси-5'-меркаптопуклеозид-3',5'-циклотиофосфаты (Xa — r) [3] (данные ТСХ на силикагеле, иодометрии и УФ-спектров) доказывает их структуру.

При получении производных (VIa — r) мы применили тиофосфорилирование 3'-ОН-группы в соединениях (IVa — r) тиофосфорилхлоридом (схема 1), отказавшись от длительного и трудоемкого метода Кука [5], впервые получившего соединения (VIa, б). Хлорокись фосфора и ее тиоаналог известны как наиболее мощные и эффективные фосфорилирующие агенты, но их применяли главным образом для фосфорилирования 5'-ОН-групп [12, 13]. Нэгвари с сотрудниками [3] проводил тиофосфорилирование 3'-ОН-группы пуклеозидных производных трехкратным избытком PSCl₃ в пиридине с обработкой промежуточного дихлорфосфата этиленциангидрином. Без такой обработки получался в основном симметричный дизамещенный пирофосфат. В других работах при обработке реакционной смеси водным пиридином таких продуктов не наблюдалось [12]. С целью увеличения скорости реакции и выхода продукта мы использовали 10-кратный избыток PSCl₃, отказавшись от обработки этиленциангидрином. В этих условиях тиофосфорилирование заканчивается за 1—2 ч. Интересно, что добавка воды или спирта в количестве 0,1—0,2 моль на 1 моль PSCl₃ не снижает, а увеличивает выход соединений (VIa — r). Подобный эффект отмечался ранее для POCl₃ [13]. Существенное внимание на скорость реакции оказывает степень очистки PSCl₃, которую перегоняли в вакууме непосредственно перед реакцией. В наших условиях обработка реакционной смеси водным пиридином не приводила к образованию значительных количеств пирофосфатов. После гидролиза (MeO)₂Tr-защитных групп бариевые соли соединений (VIa — r) кристаллизуются из воды или водного спирта. Они гомогенны по нуклеотидным производным при ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и ТСХ на силикагеле, но содержат следы тиофосфата бария и для кинетических измерений очищались гель-хроматографией на сефадексе G-10. Структуру полученных соединений подтверждали данными хроматографии и электрофореза, сравнением УФ-спектров со спектрами исходных соединений (Ia — r), по соотношению исходный нуклеотид — неорганический тиофосфат, определяемому иодометрически, и сравнением с заведомым образцом тиофосфата (VIa), полученного по методу [5].

Эффективность синтезированных мономеров в реакциях нуклеофильного замещения исследовали путем изучения кинетики взаимодействия дилитиевой соли тимидин-3'-О-тиофосфата (VIa) с двукратным избытком подпроизводных (IIa — r) и (IIIa — r), а также дилитиевых солей соединений (VIa — r) с двукратным избытком 2',5'-дидезокси-5'-подтимидина (IIa) в DMF при 22° С (схема 2). Контроль за ходом реакции осуществляли при помощи хроматографических методов и иодометрии. При гель-хроматографии соединения (XI) и (XII) элюируются раньше мономеров (IIa — r), (IIIa — r) и (VIa — r).

Для определения концентрации соединений (VIa — r) в реакционной смеси мы использовали восстанавливающие свойства тиофосфата, который



известен как стандартный восстановитель [14]. Для кинетических измерений это свойство тиофосфата ранее не использовалось. Вместо традиционного титрования мы применили спектрофотометрическое измерение концентрации раствора иода в иодистом натрии до и после добавления аликвоты реакционной смеси. При этом величина уменьшения оптического поглощения раствора иода ΔD_{350} была строго пропорциональна концентрации соединений (VIa-r), а избыток иода не вызывал дальнейшего окисления дисульфидов (IXa-r), являвшихся, как и в работе [3], единственными продуктами окисления. Дегградации P-S-C5'-связей в продуктах алкилирования тиофосфата также не наблюдалось. Минимальное количество тиофосфатов (VIa-r), определяемое этим методом, составляет 0,02–0,1 мкмоль, что на порядок меньше, чем при титровании [14]. Обработка результатов кинетических измерений показала, что экспериментальные данные хорошо укладываются на прямую линию в полулогарифмических координатах $\lg \Delta D-t$, что свидетельствует о том, что кинетика исследуемых реакций подчиняется уравнению первого порядка. Кажущиеся константы первого порядка исследованных реакций приведены в таблице. Из приведенных данных следует, что константы скоростей изученных реакций замещения сильно зависят от строения галоидпроизводных и практически не зависят от строения тиофосфатов (VIa-r). Так, пиримидиновые производные (IIIa, б) в 3–5 раз более реакционноспособны, чем пуриновые производные (IIIв, г). Эта же закономерность наблюдается и в случае нейтральных иодидов (IIa-r). Константы скоростей реакций соединения (IIa) с различными (VIa-r) практически не различаются. Природа замещаемой группы в алкилирующем компоненте имеет существенное значение, что следует из сопоставления констант скоростей реакций тиофосфата (VIa) с иодидом (IIa), (Tos)dT и (Ms)dT, различающихся на два порядка (см. рисунок), а также с первичными галоидалкилами $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{Br}$ и $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{I}$, различающихся в 20 раз. Первый порядок реакции с простыми галоидными алкилами исключает анхимерное содействие в нуклеозидных производных (IIa-r) и (IIIa-r) как причину для объяснения наблюдаемого эффекта первого порядка. На скорость реакции сильное влияние оказывают различные микропримеси, попадающие в исследуемые соединения из ионообменников и других сорбентов в процессе хроматографии. Кинетика реакций загрязненных мономеров отклоняется от уравнения первого порядка, на кинетической прямой в полулогарифмических координатах появляется характерный перегиб. Наилучшим методом очистки мономеров является гель-хроматография на сефадексах G-10 или G-25 с использованием высокоочищенных реактивов и сорбентов.

В заключение отметим, что синтезированные соединения (IIa-r), (IIIa-r) и (VIa-r) показали высокую эффективность в реакциях нуклеофильного замещения, что открывает хорошие перспективы при использовании их в качестве мономеров для синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Кинетическое исследование реакций нуклеофильного замещения с участием полученных соединений позволило

установить ряд интересных закономерностей, являющихся, вероятно, общими для реакций с участием тиофосфата и его производных и отражающих своеобразную природу этого нуклеофила. Среди свойств последнего можно выделить наличие двух ступеней ионизации, способность к тионтиольной таутомерии и высокую поляризуемость [15]. Какое-то из этих свойств, а вероятнее всего их сочетание, может быть причиной наблюдаемого эффекта подчинения кинетики изученных реакций замещения уравнения первого порядка. Исследование таких реакций продолжается, данные будут опубликованы.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксиинуклеозиды, DCC, HMPT, PSCl_3 (Merck, ФРГ), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция), силикагель КСК (опытное производство НИОХ СО АН СССР).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Kavalier, ЧССР) в системах: хлороформ — метанол, 9:1 (А), хлороформ — метанол, 4:1 (Б), хлороформ — метанол — 1 М AcONa (рН 6,5), 10:10:2 (В), хлороформ — метанол — 1 М AcONa , рН 6,5, 10:20:2 (Г). Обнаружение продуктов на хроматограммах проводили в УФ-свете (хроматоскоп), производные дезоксирибозы проявляли реактивом Динше, тиофосфатные производные — парами иода, $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -производные — парами HCl . Значения R_f приведены в таблице.

Электрофорез проводили на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) на приборе для горизонтального электрофореза Labor (Венгрия) в течение 1 ч при 75 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната аммония, рН 7,5. Значения электрофоретических подвижностей ($E_{\text{рт}}$) приведены в таблице.

Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствовали вычисленным. Температуры плавления определяли в блоке Кофлера.

УФ-спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре UR-20 Spereord UV Vis (ГДР), ИК-спектры — на спектрофотометре UR-20 (ГДР) в таблетках KBr , с 2,5%.

Количественный анализ тиофосфатных групп в соединениях (VIa—г) проводили иодометрическим методом по разности оптического поглощения $3 \cdot 10^{-5}$ М раствора иода в 3% NaI в 0,2 М AcONa , рН 6,0, при 350 нм (E 26 200) до и после добавления вещества. Продукты (IIIa—г) и (VIa—г) выделяли ионообменной хроматографией на колонках с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $h/d=10$, при разделении применяли 100 cm^3 сорбента на 1 ммоль продукта), используя для элюции линейный градиент концентрации NH_4HCO_3 (рН 7,5): 0—0,1 М — для мономеров (IIIa—г) и 0—0,2 М — для соединений (VIa—г). Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-10 ($h/d=50$), элюируя соединения (IIIa—г) водой и соединения (VIa—г) — 0,02 М LiCl .

Синтез (Tos)dT и (Ms)dT осуществляли по методу [16]. Соединения (Ia—г) и (IVa—г) получали как описано в работе [17], соединения (IIa) и (VII) — по методу [8], соединение (VIII) — в соответствии с работой [5]. Иодид (VII) хранили под слоем абс. этилацетата, взвешивая в вакуумированной колбе с краном после удаления этилацетата на пористом стеклянном фильтре. Высушивание веществ проводили в вакууме над P_2O_5 при $\sim 20^\circ\text{C}$ в течение 10—20 ч. Абсолютные растворители готовили по [18]; DMF и пиридин хранили над молекулярными ситами 4 Å.

N^6 -Бензоил-2',5'-дидезокси-5'-иодаденозин (Iв). К 0,54 г (1 ммоль) метилтрифеноксифосфонийиодида (VII) добавляли раствор 0,35 г (1 ммоль) соединения (Iв) в 2 мл DMF, выдерживали 20 мин, добавляли метанол (1 мл) и выливали в смесь 15 мл 1% раствора NaHCO_3 , содержащего 0,1 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и 15 мл хлороформа. Нижний слой отделяли, промывали водой (4×20 мл), концентрировали в вакууме до объема 2—3 мл, присыпали силикагель КСК (2—3 г), высушивали досуха в вакууме и наносили на колонку (20×1,4 см) с тем же силикагелем (сухим). Элюировали

линейным градиентом 0—10% метанола в хлороформе со скоростью 40 мл/ч. Продукт элюировался 3—4% метанолом в хлороформе. Его собирали, растворитель упаривали в вакууме, остаток кристаллизовали из хлороформа (без нагревания) для удаления примеси N⁶-бензоилданина. Кристаллы отфильтровывали в вакууме и получали 0,187 г (40%) соединения (IIв). Т. пл. 250—252° С (разл.).

2',5'-Дидезокси-N²-изобутирил-5'-иодгуанозин (IIг). Соединение (IIг) получали иодированием 1 ммоль N²-изобутирилдезоксигуанозина (Iг) аналогично соединению (IIв). Во время хроматографии на силикагеле применяли для элюции линейный градиент 5—25% метанола в хлороформе. Продукт элюировался 10—12% метанолом. Элюат упаривали, остаток растворяли в 2 мл этанола, выливали в эфир (100 мл) и получали 0,32 г (71%) соединения (IIг). Т.пл. 161—163° С (разл.).

N⁴-Анизоил-2',5'-дидезокси-5'-иодцитидин (IIб). Соединение (IIб) получали аналогично соединению (IIв) из 1 ммоль N⁴-анизоилцитидина (Iб). Выход после кристаллизации из хлороформа 0,205 г (43%).

2',5'-Дидезокси-5'-иодтимидин-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфат (IIIа). К суспензии пиридиниевой соли S-(2-карбамоилэтил)тиофосфата (VIII), полученной из 1,28 г (4 ммоль) его бариевой соли [5] пропусканием через дауэкс 50 в пиридиниевой форме (5 мл) в 5 мл смеси НМРТ—пиридин (8:2), прибавляли 0,35 г (1 ммоль) соединения (IIа) и полученную смесь высушивали упариванием с абс.пиридином (3×5 мл) в вакууме, после чего добавляли 1,6 г (8 ммоль) ДСС и выдерживали 20 ч в темноте при энергичном встряхивании. Осадок дициклогексилмочевины и непрореагировавшего соединения (VIII) отфильтровывали, промывали пиридином (3×3 мл), фильтр и промывную жидкость концентрировали в вакууме до объема 5 мл, обрабатывали 10 мл воды и 5 мл эфира. Эфирный слой отделяли, экстракцию эфиром повторяли еще дважды, водный слой фильтровали, доводили до рН 7,2% раствором аммиака и продукт выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующей очисткой геле-хроматографией (см. выше). Раствор соединения (IIIа) в воде пропускали через колонку (5 мл) с дауэксом 50 (Li⁺) и элюат упаривали в вакууме. Продукт растворяли в метаноле (2 мл), выливали в эфир (100 мл) и получали 0,41 г (81%) литиевой соли тиофосфата (IIIа).

N⁴-Анизоил-2',5'-дидезокси-5'-иодцитидин-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфат (IIIб) получали тиофосфорилированием 1 ммоль соединения (IIб) по аналогии с соединением (IIIа). Выход литиевой соли соединения (IIIб) 0,47 г (77%).

N⁶-Бензоил-2',5'-дидезокси-5'-иодаденозин-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфат (IIIв). Тиофосфорилирование 1 ммоль соединения (IIв) в условиях, приведенных для тиофосфата (IIIа), дало 0,44 г (72%) литиевой соли производного (IIIв).

2'-5'-дидезокси-N²-изобутирил-5'-иодгуанозин-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфат (IIIг). Соединение (IIIг) получали из 1 ммоль соединения (IIг) аналогично соединению (IIIа). Выход литиевой соли производного (IIIг) 0,44 г (73%).

2'-Дезоксигимидин-3'-O-тиофосфат (VIа). 0,54 г (1 ммоль) соединения (IVа) высушивали упариванием с абс.пиридином (10 мл) и обрабатывали 10 мл смеси пиридин—тиофосфорилхлорид (9:1 по объему, 10 ммоль PSCl₃) при 0° С. После растворения соединения (IVа) реакционную смесь выдерживали 2 ч при 5° С. Для контроля за ходом реакции использовали ТСХ на силуфолу в системе А и электрофорез на бумаге (см. таблицу). Раствор упаривали в вакууме до образования масла при температуре бани не выше 20° С. Жидкое масло растворяли в пиридине (5 мл) и выливали в ледяную воду (10 мл), затем добавляли 1,5 мл триэтиламина и смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в пиридине, осадок триэтиламонийхлорида отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, а остаток растворяли в толуоле (20 мл) и упаривали для удаления пиридина (операцию повторяли дважды). (MeO)₂Tr-защитную группу удаляли 80% уксусной кислотой, как описано в работе [17].

Триэтиламмониевую соль производного (VIa) растворяли в 10% водном растворе ацетата бария (10 мл), титровали раствор 0,2 М Ва(ОН)₂ до pH 7,5–8, осадок тиофосфата бария и диметокситриганаола отфильтровывали и фильтрат обрабатывали 20 мл этанола. Осадок продукта отфильтровывали, промывали ацетоном (2×10 мл) и сушили, а затем очищали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-10, как описано выше. Дилитиевую соль тиофосфата (VIa) получали пропусканием через колонку (10 мл) с дауэксом 50 (Li⁺). Продукт растворяли в метаноле (2 мл), выливали в ацетон (50 мл) и получали 0,31 (80%) дигидрата дилитиевой соли соединения (VIa). Соединение (VIa) совпадало по хроматографическим и спектральным данным с заведомым образцом тиофосфата (VIa), полученным по методу [5].

N⁴-Анизоил-2'-дезоксигуанидин-3'-О-тиофосфат (VIb). Тиофосфорилирование 1 ммоль соединения (IVб) проводили как описано при получении соединения (VIa). После отделения осадка хлоргидрата триэтиламина пиридиновый раствор концентрировали в вакууме до объема 2 мл, прибавляли к нему смесь хлороформ–метанол (50:5) и экстрагировали водой (2×5 мл). Водные слои объединяли, промывали смесью хлороформ–метанол–пиридин (8:2:1, 2×10 мл). Органические слои объединяли с основной порцией хлороформного раствора, упаривали, удаляли пиридин упариванием с толуолом (2×10 мл) и обрабатывали сухой остаток 10% раствором ССl₃СООН в 10 мл смеси хлороформ–метанол (7:3), выдерживали 1 ч и добавляли 30 мл 0,2 М Ва(ОН)₂ до pH 7,5. Выпавший осадок бариевой соли тиофосфата (VIb) отфильтровывали, промывали водой (2×5 мл), спиртом (3×5 мл) и ацетоном (3×5 мл), сушили. Осадок перемешивали в воде (15 мл) с 5 мл дауэкса 50 (Li⁺) до растворения, наносили на колонку с 10 мл той же смолы, элюировали водой, концентрировали до объема 2 мл и далее выделяли аналогично соединению (VIa), опуская стадию перевода в литиевую соль. Получили 0,34 г (68%) дигидрата дилитиевой соли соединения (VIb).

N⁶-Бензоил-2'-дезоксаденозин-3'-О-тиофосфат (VIв). Тиофосфорилирование 1 ммоль соединения (IVв) в условиях, приведенных для производного (VIб), дало после гель-хроматографии на сефадексе G-10 0,36 г (72%) дигидрата дилитиевой соли соединения (VIв). Гидролиз раствором ССl₃СООН проводили 15 мин.

2'-Дезокси-N²-изобутирилгуанозин-3'-О-тиофосфат (VIг). Соединение (VIг) получали аналогично тиофосфату (VIв) из 1 ммоль нуклеозида (IVг), выход дигидрата дилитиевой соли соединения (VIг) 0,37 г (76%).

Кинетика взаимодействия мономеров (VIa–г) с иодпроизводными (IIa–г) и (IIIa–г). Дилитиевую соль соединения (VIa–г) (5 мкмоль) растворяли в DMF (0,05 мл) и прибавляли раствор (10 мкмоль) соединения (IIa–г) или (IIIa–г) в 0,05 мл DMF и реакционную смесь выдерживали при 22° С. При ТСХ на силикагеле в системе В наблюдали исчезновение исходных тиофосфатов (VIa–г) и появление дитионуклеотидов (XI) и (XII), не содержащих концевой тиофосфата и обладающих большей, чем производные (VIa–г), подвижностью (см. таблицу). Аликвоты по 2 мкл выливали в спектрофотометрическую кювету (*l*=1 см), содержащую 2 мл 3,7·10⁻⁵ М раствора I₂ в 3% NaI и 0,2 М АсОНа, pH 6,0, в 50% метаноле (*D*=1 ОЕ₃₅₀), перемешивали и измеряли оптическое поглощение полученного раствора при 350 нм. По полученным данным строили график зависимости lg Δ*D*–*t* и рассчитывали константу скорости первого порядка.

Кинетика отщепления S-β-цианэтильных групп в соединениях (IIIa–г). Соединение (IIIa–г) (5 мкмоль) растворяли в воде (50 мкл) и прибавляли 50 мкл 1 М LiОН. Кинетические измерения проводили по приведенной выше методике, используя раствор I₂, содержащий 0,2 М АсОНа (pH 5). Расчет констант проводили интегральным методом, считая, что концентрация образующихся в ходе гидролиза 2',5'-дидезоксис-5'-иоднуклеозид-3'-тиофосфатов прямо пропорциональна разности Δ*D*'=Δ*D*_∞–Δ*D*, где Δ*D*_∞ – изменение поглощения раствора I₂ при добавлении аликвоты реакционной смеси через промежуток времени, равный

10 полупериодам реакции элиминирования, ΔD — изменение поглощения раствора I_2 в текущий момент. Полученные значения кажущихся констант скоростей данной реакции близки по величине и составляли $0,17 \pm 0,012 \text{ мин}^{-1}$, что соответствует $\tau_{1/2}$ 4 мин.

Реакция циклизации соединений (IIIa-г). Раствор тетраэтиламмониевой соли соединения (IIIa-г) (2 мкмоль) в 40 мкл 40% Et_4NON выдерживали 10 мин в вакууме водоструйного насоса, разбавляли 0,4 мл DMF, выдерживали еще 5 мин и нейтрализовали даузоксом 50 (H^+). Раствор наносили на пластинку силуфола ($10 \times 10 \text{ см}$). ТСХ проводили в системе В, циклотрифосфаты (Ха-г) элюировали водой и определяли их концентрацию спектрофотометрически при 260 нм, используя в качестве контроля элюат соответствующих чистых зон силуфола. Результаты, представленные в виде молярного отношения исходного вещества — тиофосфат — иода, приведены в таблице. При расчете полагали, что количество образовавшихся соединений (Ха-г) эквивалентно содержанию тиофосфатных групп и иода в исследуемом соединении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Michelson A. M.* J. Chem. Soc., 1962, № 3, p. 979–982.
2. *Nagyvary J., Chladek S., Roe J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun, 1970, v. 39, № 5, p. 878–882.
3. *Chladek S., Nagyvary J.* J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 6, p. 2079–2085.
4. *Kress J., Nagpal K. L., Nagyvary J., Uchic J.* Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 1, p. 1–9.
5. *Cook A. F.* J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 1, p. 190–195.
6. *Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189–201.
7. *Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П.* Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1423–1425.
8. *Verheyden J. P. H., Moffat J. G.* J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 7, p. 2319–2326.
9. *Физер Л., Физер М.* Реагенты для органического синтеза, т. I. М.: Мир, 1970, с. 426.
10. А.с. 910652 (СССР). *Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В.* — Опубл. в Б.И., 1982, бюлл. № 9.
11. *Prisbe E. J., Smejkal J., Verheyden J. P. H., Moffat J. G.* J. Org. Chem., 1976, v. 41, № 10, p. 1836–1846.
12. *Hata T., Nakagawa J. A.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1970, v. 43, № 11, p. 3619–3620.
13. *Sova T., Ouchi S. A.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1975, v. 48, № 7, p. 2084–2090.
14. *Akerfeldt S.* Acta chem. scand., 1962, v. 16, № 8, p. 1897–1907.
15. *Хадсон Р.* Структура и механизм реакций фосфорорганических соединений. М.: Мир, 1967, с. 146–149.
16. *Michelson A. M., Todd A. R.* J. Chem. Soc., 1955, № 3, p. 816–823.
17. *Shaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G.* J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 23, p. 3821–3827.
18. Общий практикум по органической химии. М.: Мир, 1965, с. 605–629.

Поступила в редакцию

1.III.1982

После доработки

5.V.1982

PHOSPHOROTHIOATE ANALOGS OF NUCLEIC ACIDS. I. THE SYNTHESIS AND PROPERTIES OF MONOMERS FOR PREPARING 5'-S-PHOSPHOROTHIOATE ANALOGS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDE

KUMAREV V. P., BOGACHEV V. S., KOBSEV V. F., BARANOVA L. V.

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

5'-Iodo- and 3'-phosphorothioate derivatives of four major deoxyribonucleosides used in the synthesis of 5'-S-phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides with unnatural P-S-C (5') bonds were prepared: 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleosides (Ia-d) from corresponding N-protected deoxynucleosides and methyltriphenoxyphosphonium iodide in DMF; 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleoside-3'-(S- β -cyanoethyl) phosphorothioates (IIa-d) by thiophosphorylation of compounds (Ia-d) with a mixture of S- β -carbamoyl ethyl phosphorothioate and dicyclohexylcarbodiimide in hexamethyltriphosphoramide — pyridine; deoxynucleoside-3'-phosphorothioates (IIIa-d) from the corresponding N-protected 5'-O-dimethoxytritylnucleosides and PSCl_3 in pyridine. Nucleophilic reactions of phosphorothioates (IIIa-d) with the compounds (Ia-d) and (IIa-d) as well as 5'-O-tosyl- and 5'-O-mesylthymidine and some primary haloid alkyls in DMF were investigated. All studied reactions were found to have first order kinetics, the rate constants being estimated by iodometry. The reactivity of 2',5'-dideoxy-5'-iodothymidine in displacement reactions was shown to be 2 order of magnitude greater than that of corresponding tosyl- and mesyl derivatives.