



УДК 547.963.32.07 : 543.544 : 543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.СИНТЕЗ И РАЗДЕЛЕНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ
ДИ- И ТЕТРАТИМИДИЛАТОВ

Абрамова Т. В., Лебедев А. В.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Синтезированы и разделены с помощью колоночной хроматографии на силикагеле на индивидуальные диастереомеры (с энантиомерными конфигурациями при атоме фосфора) $(Tr)Tr(CiPh)T(As)$, $(Tr)Tr(Et)T(As)$ и $Tr(Et)T$. Из индивидуальных диастереомеров синтезированы, с последующей заменой *n*-хлорфенильной группы на этильную, тетра- и три-нуклеотиды $(Tr)Tr(Et)Tr(Et)Tr(Et)T(As)$ и $(Tr)Tr(Et)Tr(Et)Tr(Et)Tr(Et)T(CiPh)$, представляющие собой смесь двух диастереомеров каждый (по второму от 5'-конца межнуклеотидному атому фосфора). Найден условия для разделения последних методом обращенно-фазовой хроматографии. Установлено, что при замене *n*-хлорфенильной группы $(Tr)Tr(CiPh)T(As)$ на этильную с помощью CsF происходит рацемизация у асимметрического атома фосфора. Полученные соединения охарактеризованы различными методами (ТСХ, УФ-, КД-, ЯМР-спектроскопия).

В последнее время для комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот внутри живых клеток успешно используют неионные аналоги олигонуклеотидов с этерифицированными межнуклеотидными фосфатами [1, 2]. Эти аналоги обладают рядом преимуществ по сравнению с диэфирными олигонуклеотидами. Они легко проникают через клеточные мембраны [3, 4] и устойчивы к действию нуклеаз [5, 6]. Однако эти соединения из-за наличия асимметрических атомов фосфора представляют собой смесь большого числа диастереомеров, которые обладают различной способностью к образованию комплексов с комплементарными им поли- и олигонуклеотидами [7, 8]. Поэтому разработка подходов к синтезу и выделению индивидуальных диастереомеров неионных аналогов олигонуклеотидов, образующих наиболее прочные комплексы с поли- и олигонуклеотидами, является важной задачей.

Ранее были синтезированы и исследованы в виде неразделенной смеси диастереомеры $Tr(Et)T$ [6]. В настоящей работе синтезированы и разделены диастереомеры этиловых эфиров ди- и тетра-тимицилатов, изучены их некоторые физико-химические свойства.

На первом этапе работы из $(Tr)T$ и $(CiPh)pT(As)$ по методике [9] был синтезирован $(Tr)Tr(CiPh)T(As)$, представляющий собой смесь двух диастереомеров в соотношении примерно 1:1 (из данных спектров ^{31}P -ЯМР, химические сдвиги приведены в табл. 1). Эти изомеры были разделены на колонке с силикагелем так, как описано в работе [10].

n-Хлорфенильные группы в $(Tr)Tr'(CiPh)T(As)$ и $(Tr)Tr''(CiPh)T(As)$ * были заменены на этильные группы переэтерификацией в присутствии CsF и этанола [11]. В результате переэтерификации каждого из ин-

Сокращения: TPS – 2,4,6-триизопропилсульфонил, CiPh – 4-хлорфенил. Префикс d в обозначении производных 2'-дезокситимидина всюду опущен, так как в статье упоминаются только нуклеозиды дезоксирибы.

* Обозначения r' и r'' соответствуют тетраэдрическим атомам фосфора, входящим в состав исследуемых триэфирных производных и имеющих энантиомерную конфигурацию. В связи с тем что в данной работе абсолютную конфигурацию при атомах фосфора не устанавливали, изомеры обозначены в порядке элюции (r' , затем r'') или в порядке убывания значений хроматографических подвижностей.

Значения хроматографических подвижностей при ТСХ на силикагеле и химические сдвиги ^{31}P -ЯМР производных ди- и тетратимидилатов

Соединение	Система растворителей	R_f	^{31}P -ЯМР, δ , м. д.
(Tr)Tp'(ClPh)T(Ac)	A	0,25	7,56 *
(Tr)Tp''(ClPh)T(Ac)	A	0,20	7,10 *
(Tr)Tp'(Et)T(Ac)	A	0,12	2,68 **
(Tr)Tp''(Et)T(Ac)	A	0,10	2,68 **
(Tr)Tp''(Et)T(Ac)	B	0,23	
(Tr)Tp'(Et)T	B	0,20	
(Tr)Tp''(Et)T	B	0,12	
Tp'(Et)T(Ac) и Tp''(Et)E(Ac)	B	0,15	
Tp'(Et)T и Tp''(Et)T			
(Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh)Tp'(Et)T(Ac)			1,83; 2,51; 2,78; 6,90; 7,36 *
(Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)Tp''(Et)T(Ac)			1,46; 1,55; 2,01; 6,81; 7,64 *
(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)T(Ac)	B	0,42 ***	1,76; 1,83; 2,33; 2,59 *
(Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T(Ac)	B	0,41 ***	1,48; 1,63; 1,89; 2,17 *

* Спектр записан в хлороформе. ** Спектр записан в условиях реакции перэтерификации. *** Приведено значение хроматографической подвижности тетратимидилата после удаления ацетильной защиты.

индивидуальных изомеров (Tr)Tp(ClPh)T(Ac), а также их смеси образуется смесь диастереомеров (Tr)Tp(Et)T(Ac) во всех случаях в соотношении, близком к 1 : 1. Таким образом, механизм реакции перэтерификации включает в себя стадию (или стадии), сопровождающуюся рацемизацией у атома фосфора.

Диастереомеры этиловых эфиров динуклеозидфосфата (Tr)Tp'(Et)T(Ac) и (Tr)Tp''(Et)T(Ac) были разделены многократной (4–6 раз) хроматографией на колонке с силикагелем. Отметим, что аналогичным образом были разделены диастереомеры (Tr)Tp(Et)T, однако не удалось подобрать систему растворителей для разделения изомеров Tp(Et)T или Tp(Et)T(Ac). Значения хроматографических подвижностей вышеуказанных соединений приведены в табл. 1.

После удаления тригильной и ацетильной защитных групп с индивидуальных диастереомеров (Tr)Tp(Et)T(Ac) были выделены Tp'(Et)T и Tp''(Et)T и охарактеризованы с помощью УФ-, КД-, а также ^1H -ЯМР-спектров. По данным ТСХ и спектрам ^1H -ЯМР, полученные триэфиры не содержали заметных примесей. УФ-спектры изомеров и TpT практически не различаются ($\lambda_{\text{мин}}$ 237 нм, $\lambda_{\text{макс}}$ 266 нм), значения коэффициентов экстинкции $\epsilon_{\text{макс}}$ изомеров близки между собой и равны 17 500 и 18 100 (в расчете на 100% содержание вещества) для Tp'(Et)T и Tp''(Et)T соответственно, что согласуется с данными работы [6]. Спектры КД диастереомеров Tp(Et)T заметно отличаются от спектра КД TpT как по положению минимума, так и по амплитуде эффектов Коттона, причем спектр Tp''(Et)T ближе к спектру диэфира TpT (рис. 1). Близость спектров КД одного из изомеров неионного аналога динуклеотида (триэфира или фосфоната) и соответствующего природного динуклеотида отмечалась также в работах [5, 12].

Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР изомеров Tp(Et)T (табл. 2, 3) проведено с помощью анализа тонкой структуры сигналов, а также экспериментов по двойному резонансу и согласуется с литературными данными для подобных соединений [12, 13]. Однако наблюдается значительное различие в величине химического сдвига (~0,45 м.д.) метильных протонов этильной группы Tp(Et)T, приведенной в работе [6], по сравнению с данными настоящей работы. Из табл. 2 видно, что химические сдвиги соответствующих протонов для индивидуальных изомеров Tp(Et)T в ряде случаев заметно различаются (0,02–0,03 м.д.). Нами были рассчитаны по формулам, приведенным в работе [14], параметры конформации 2'-дезоксирибозофосфатного остова для Tp'(Et)T и Tp''(Et)T (см. табл. 4). Ока-

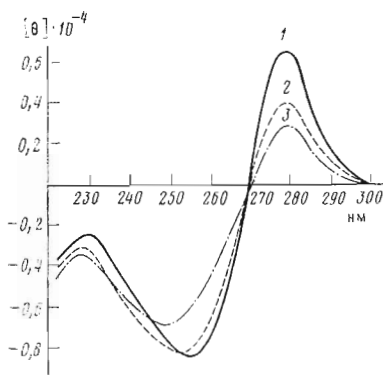


Рис. 1

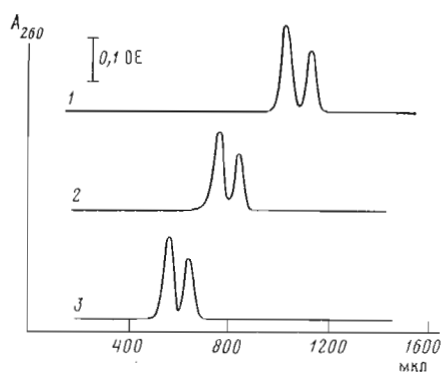


Рис. 3

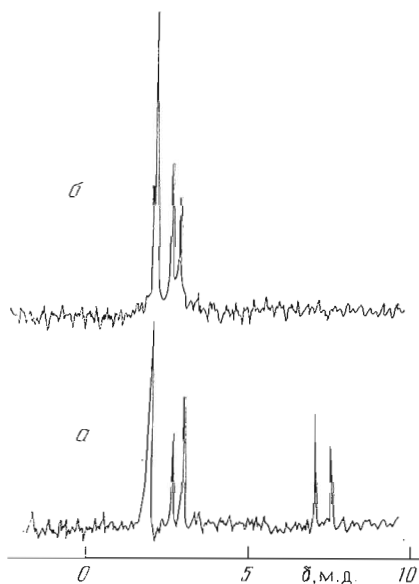


Рис. 2

Рис. 1. КД-спектры TrT (1), $\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (2) и $\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (3) в буфере, содержащем 0,01 M трис-NCl и 0,01 M MgCl_2 , pH 7,5. Концентрация динуклеозидмонофосфатов $5 \cdot 10^{-5}$ M

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР (Tr) Tr' ·(Et) $\text{Tr}(\text{ClPh})\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{Ac})$ (а) и (Tr) $\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}(\text{Et})\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{Ac})$ (б) в хлороформе. Концентрация тетрагидримидилатов 0,003 M, объем 1 мл, диаметр ампулы 40 мм, ширина импульса 15 мкс ($\sim 90^\circ$), задержка между импульсами 5 с, 5000 накопленный

Рис. 3. Профили хроматографического разделения на приборе «Обь-4» диастереомеров (Tr) $\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}(\text{Et})$ · $\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (1), (Tr) $\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}(\text{Et})$ · $\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}(\text{Tr}(\text{ClPh}))$ (2), (Tr) $\text{Tr}'(\text{Et})$ · $\text{Tr}(\text{Et})\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}(\text{ClPh})$ (3)

залось, что конформации сахарофосфатного остова обоих диастереомеров близки между собой и подобны конформациям фосфонатных аналогов [12] и TrT [13]. В случае TrT , однако, доля конформации $g'g'$ для связи $\text{C5}'\text{-O}$ значительно выше (90%), чем для изомеров $\text{Tr}(\text{Et})\text{T}$ (64 и 65%, табл. 4) и фосфонатных производных [12].

Таким образом, совокупность данных спектроскопии УФ, КД и ЯМР свидетельствует, что конформационные состояния диастереомеров $\text{Tr}(\text{Et})\text{T}$ различаются в небольшой степени.

На следующем этапе работы было проведено фосфорилирование (Tr) $\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ и (Tr) $\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ с помощью *n*-хлорфенилфосфобистриазолида по методу [15]. Были получены (Tr) $\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}(\text{ClPh}, \text{CNEt})$ и (Tr) $\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}(\text{ClPh}, \text{CNEt})$ каждый в виде смеси двух диастереомеров, энантиомерных по 3'-концевому атому фосфора. После удаления 2-цианэтильной защитной группы индивидуальные изомеры полученных динуклеотидов конденсировали с соответствующими изомерами $\text{Tr}(\text{Et})\text{T}(\text{Ac})$ в присутствии TPS-тетразолида в пиридине. После хроматографического выделения в спектрах ^{31}P -ЯМР продуктов конденсации были зарегистрированы две группы сигналов: в области 2 м.д., характерной для алкиловых эфиров, и в области 7 м.д., характерной для ариловых эфиров по междунуклеотидному атому фосфора, с соотношением интенсивностей сигналов между ними 2:1 соответственно (рис. 2). Это согласуется с ожидаемым спектром ^{31}P -ЯМР [16] для тетрагидримидилатов (Tr) $\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}(\text{ClPh})\text{Tr}'$ ·

Таблица 2

Химические сдвиги (δ , м. д.) в спектрах ^1H -ЯМР Тр'(Et)Т и Тр''(Et)Т

Протон	Тр'(Et)Т *		Тр''(Et)Т **	
	Тр	рТ	Тр	рТ
6-Н	7,55	7,65	7,56	7,65
5-CH ₃	1,87	1,86	1,88	1,88
1'-Н	6,25	6,30	6,26	6,30
2'-На	2,42	2,42	2,44	2,42
2'-Нб	2,59	2,42	2,58	2,42
3'-Н	5,07	4,57	5,07	4,54
4'-Н	4,28	4,17	4,28	4,17
5'-На	3,78	4,42	3,81	4,44
5'-Нб	3,79	4,34	3,78	4,35

* $\delta_{\text{CH}_3\text{CH}_2}$ 1,34 м. д., $\delta_{\text{CH}_3\text{CH}_2}$ 4,25 м. д.** $\delta_{\text{CH}_3\text{CH}_2}$ 1,36 м. д., $\delta_{\text{CH}_3\text{CH}_2}$ 4,25 м. д.

Таблица 3

Константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц) в спектрах ^1H -ЯМР Тр'(Et)Т и Тр''(Et)Т

Взаимодействующие ядра	Тр'(Et)Т		Тр''(Et)Т	
	Тр	рТ	Тр	рТ
6, CH ₃	1,2	1,2	1,2	1,2
1',2'a	8,0	6,5	8,2	6,7
1',2'б	6,4	6,5	6,1	6,7
3',2'a	6,0	6,0	6,1	5,9
3',2'б	2,6	6,0	2,7	5,9
2'a,2'б	-14,4		-14,4	
3',4'	2,6	4,6	2,5	4,4
4',5'a	3,8	3,0	3,6	2,8
4',5'б	4,4	4,2	4,2	4,4
5'a,5'б	-12,8	-11,6	-12,8	-11,7
2'a,P	1,2		0,5	
3',P	6,1		5,5	
5'a,P		5,8		6,0
5'б,P		5,8		5,5
H ^α ,P *	8,4		8,7	
H ^β ,P *	0,8		1,0	
H ^α ,H ^β *	7,2		7,1	

* Обозначения H^α, H^β соответствуют протонам при C^α- и C^β-атомах этокси-группы.

Таблица 4

Параметры конформаций Тр'(Et)Т и Тр''(Et)Т по данным спектров ^1H -ЯМР

Соединение	Содержание ² E-конформера, %		Содержание gg-конформера, %		Содержание g'g'-конформера	Φ
	Тр	рТ	Тр	рТ		
Тр'(Et)Т	75	59	55	67	64	197/283
Тр''(Et)Т	77	60	61	67	65	195/285

(Et)T(Ac) и (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)Tp''(Et)T(Ac). Соотношение диастереомеров, определенное из спектров ^{31}P -ЯМР, составляет 6 : 4 для первого и 5 : 4 для второго тетратимидилата.

При замене *n*-хлорфенильной группы на этильную в (Tr)Tp'(Et)Tp·(ClPh)Tp'(Et)T(Ac) в спектре ^{31}P -ЯМР сигналы среднего атома фосфора (δ 6,90 и 7,36 м.д.) исчезают, а в области 2 м.д. появляются дополнительные сигналы (рис. 2), причем структура сигналов и соотношение интенсивностей свидетельствуют об образовании двух соединений, содержащих только этилированные межнуклеотидные фосфатные группы. Эти данные наряду с данными химического анализа (наличие тритильной и ацетильной групп) и УФ-спектрами (соответствуют спектрам олиготимидилатов) согласуются с образованием смеси двух диастереомеров (Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)T(Ac). Аналогичным образом была получена смесь диастереомеров (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T(Ac). Хроматографические подвижности тетратимидилатов, полученных из разных диастереомеров динуклеотидов, различаются между собой (табл. 1; предварительно удаляли ацетильную защитную группу), но внутри каждого из тетратимидилатов более тонкого разделения на диастереомеры не обнаружено. Диастереомеры удалось разделить с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Обь-4» (рис. 3). Соотношение диастереомеров, определенное из площадей пиков, согласуется с данными ^{31}P -ЯМР и составляет $\sim 7 : 5$. После фосфорилирования по 3'-ОН-группе каждый из тетратимидилатов также был разделен на индивидуальные диастереомеры (рис. 3) с использованием как хроматографа «Обь-4», так и «Алтех», в последнем случае в количестве 10 ОЕ. УФ-спектры всех четырех индивидуальных диастереомеров тетрануклеотидов практически совпадали, а сами соединения были гомогенны при анализе методом ТСХ на силикагеле и при анализе обращенно-фазовой хроматографией на хроматографе «Обь-4».

Недавно был осуществлен стереоселективный синтез *n*-хлорфениловых эфиров динуклеотидов [17]. Однако этот метод нельзя применять для получения индивидуальных диастереомеров этиловых эфиров динуклеозидмонофосфатов, поскольку при замене *n*-хлорфенильной группы на этильную происходит рацемизация по межнуклеотидному атому фосфора (см. выше). В то же время в отдельных экспериментах с использованием ТСХ на силикагеле нами установлено, что выдерживание индивидуальных диастереомеров (Tr)Tp(Et)T(Ac) в условиях реакции перэтерификации в присутствии CsF и этанола не приводит к рацемизации у атома фосфора. Следовательно, синтез индивидуальных диастереомеров этиловых триэфиров олигонуклеотидов при каждом удлинении олигонуклеотидной цепи должен включать в себя стадии конденсации *n*-хлорфенилового эфира Р-компонента с ОН-компонентом, перэтерификации и разделения диастереомеров.

Экспериментальная часть

В работе использовали (Tr)T, (ClPh)pT(Ac), TPS-хлорид — препараты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР, абсолютные пиридин, 1,4-диоксан, хлороформ, этанол, ацетонитрил, триэтиламин, диэтиловый эфир. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel F 60 254 (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ — этилацетат — этанол, 25 : 75 : 2 (А), 25 : 75 : 10 (Б) и 25 : 75 : 20 (В), колоночную хроматографию — на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, ФРГ).

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали в импульсном режиме с фурье-преобразованием на спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) (рабочая частота 36,43 МГц). Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% H_3PO_4 при 30° С. Для сигналов в более сильном поле, чем H_3PO_4 , приняты положительные значения. Спектры ^1H -ЯМР записывали на спектрометре XL-200 (Varian, США) (рабочая частота 200 МГц) в D_2O , рН 6,5 (без поправки на изотопный эффект) при 23° С. В качестве внутреннего стандарта использовали $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Specord (Karl Zeiss, Уена, ГДР), КД-спектры — на дихрографе Mark-3 (Roussel Jouan, Франция), используя растворы исследуемых соединений в буфере, содержащем 0,01 М трис-НСl и 0,01 М MgCl₂ (рН 7,5) при 25° С в обоих случаях.

Обращенно-фазовую хроматографию на хроматографах «Обь-4» и «Altex» (Altex, США) проводили в буфере метанол — 0,066 М трис-АсОН, 7:3, рН 7,8. Колонка со смолой Nucleosil 5 С-18 (Machery-Nagel, ФРГ) размером 2×62 мм («Обь-4»), скорость хроматографии 20 мкл/мин; колонка со смолой Ultrasphere ODS (Altex, США) размером 4,6×250 мм («Altex»), скорость хроматографии 1 мл/мин.

(Tr)Tp(ClPh)T(Ac) получали по методу [9]. К 4,8 ммоль (Tr)Т и 5,0 ммоль (ClPh)рТ(Ac) добавили 15 ммоль TPS-тетразолида и 50 мл абс. пиридина. Через 1 ч добавили 50 мл воды, смесь упарили, растворили в хлороформе и 4 раза промыли водой. Высушенный хлороформный слой хроматографировали на колонке (6×10 см) с силикагелем в системе хлороформ — этилацетат — этанол, 25:75:1. Получено 1,5 ммоль (Tr)Tp'(ClPh)T(Ac), 1,4 ммоль (Tr)Tp''(ClPh)T(Ac) и 1,1 ммоль смеси указанных диастереомеров.

(Tr)Tp'(Et)T(Ac) и (Tr)Tp''(Et)T(Ac). 4,4 ммоль смеси диастереомеров (Tr)Tp(ClPh)T(Ac) растворили в 47 мл абс. хлороформа и добавили 47 мл 0,93 М раствора CsF в абс. этаноле. Через 1 ч смесь упарили, растворили в 50 мл хлороформа и промыли 5 раз водой. Высушенный хлороформный слой хроматографировали на колонке (2,5×30 см) с силикагелем в системе хлороформ — этилацетат, 1:3, в градиенте концентрации этанола от 1 до 3% (объем градиента 2 л). Фракции, содержащие смесь диастереомеров, рехроматографировали 4–6 раз. Получено 2,0 ммоль (Tr)Tp'(Et)T(Ac) и 1,8 ммоль (Tr)Tp''(Et)T(Ac).

(Tr)Tp'(Et)T и (Tr)Tp''(Et)T. 2,0 ммоль (Tr)Tp'(Et)T(Ac) растворили в 25 мл смеси пиридин — 25% водный аммиак, 1:1, и поместили в термостат при 60° С. Через 4 ч смесь упарили, растворили в хлороформе и хроматографировали на колонке (6×10 см) с силикагелем в градиенте концентрации этанола в хлороформе от 0 до 7% (объем градиента 2 л). Получено 1,8 ммоль (Tr)Tp'(Et)T. Аналогично из 1,8 ммоль (Tr)Tp''(Et)T(Ac) получено 1,6 ммоль (Tr)Tp''(Et)T.

Tp'(Et)T(Ac) и Tp''(Et)T(Ac). 440 ОЕ₂₆₆ (измерено в этаноле) (Tr)Tp''(Et)T(Ac) растворили в 5 мл 80% уксусной кислоты, выдержали 15 мин при кипении, упарили, растворили в хлороформе и хроматографировали в градиенте концентрации метанола от 0 до 10% в хлороформе (объем градиента 0,5 л) на колонке с силикагелем (3×6 см). Получено 400 ОЕ Tp''(Et)T(Ac). Аналогично получено 700 ОЕ Tp'(Et)T(Ac).

Tp'(Et)T и Tp''(Et)T. 1,8 ммоль (Tr)Tp'(Et)T выдержали 15 мин в 80% уксусной кислоте (40 мл) при кипении, смесь упарили и хроматографировали на колонке с силикагелем (6×10 см) в системе хлороформ — этилацетат — этанол, 8:2:2. Фракции, содержащие Tp'(Et)T, объединили и упарили. Маслообразный осадок растворили в 3 мл смеси хлороформ — метанол, 2:5, и вылили в 100 мл абс. диэтилового эфира, осадок отделили. Получено 1,5 ммоль Tp'(Et)T. Аналогично получили 1,3 ммоль Tp''(Et)T.

(Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh) и (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh). К 1 ммоль триазола в 1 мл абс. 1,4-диоксана добавили 0,2 ммоль *n*-хлорфенилфосфодихлорида, выдержали 30 мин, профильтровали и 0,5 мл раствора добавили к 0,05 ммоль (Tr)Tp'(Et)T в 0,5 мл абс. пиридина. Через 30 мин добавили 5 ммоль 2-цианэтанола, выдержали 20 мин, упарили, растворили в хлороформе и хроматографировали на колонке (2,5×4 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол, 97:3. Получено 0,04 ммоль (Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh, CNEt). 2-Цианэтильную группу удалили обработкой смесью ацетонитрил — триэтиламин, 1:1, в течение 1 ч [18]. Смесь упарили и использовали в синтезе тетратимидлатов. Фосфорилирование 0,05 ммоль (Tr)Tp''(Et)T проводили аналогично.

(Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh)Tp'(Et)T(Ac) и (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)Tp''(Et)T(Ac). 300 ОЕ₂₆₆ (в этаноле) (Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh) и 300 ОЕ Tp'(Et)T(Ac) 3 раза упарили с абс. пиридином, добавили 20 мг TPS-тет-

разолида и 200 мкл абс. пиридина. Через 30 мин анализ реакционной смеси методом ТСХ на силикагеле показал отсутствие исходных ОН- и Р-компонентов и образование одного соединения нуклеотидной природы. Смесь разбавили 1 мл хлороформа и сразу нанесли на колонку (3×6 см) с силикагелем. Элюцию проводили в градиенте концентрации метанола в хлороформе от 0 до 5% (объем градиента 0,5 л). Фракции, содержащие чистый нуклеотидный материал, объединили, упарили и дважды пересаживали выливанием в абс. диэтиловый эфир (по 10 мл) раствора продукта в 0,5 мл хлороформа. Получено 9 мг (~200 ОЕ) (Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh)Tp'(Et)T(Ac). Аналогично из 150 ОЕ (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh) и 150 ОЕ Tp''(Et)T(Ac) получено 6 мг (~130 ОЕ) (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)Tp''(Et)T(Ac).

(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)T(Ac) и (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T(Ac). 160 ОЕ₂₆₆ (в метаноле) смеси диастереомеров (Tr)Tp'(Et)Tp(ClPh)Tp'×(Et)T(Ac) упарили 3 раза со смесью абс. этанола и хлороформа, 1:1, растворили в 90 мкл абс. хлороформа и добавили 90 мкл 0,9 М раствора CsF в абс. этаноле. Через 1 ч раствор упарили, добавили 0,5 мл хлороформа и 5 раз промыли водой (по 1 мл). Хлороформный слой упарили, остаток растворили в 100 мкл смеси хлороформ — метанол, 95:5, нанесли на колонку (1×4 см) с силикагелем и элюировали в градиенте концентрации метанола в хлороформе от 5 до 15% (объем градиента 100 мл). Получено 150 ОЕ смеси диастереомеров (Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)T(Ac). Аналогично из 106 ОЕ смеси диастереомеров (Tr)Tp''(Et)Tp(ClPh)Tp''(Et)×T(Ac) получено 90 ОЕ (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T(Ac).

(Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh) и (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)×Tp(ClPh). 90 ОЕ₂₆₆ (в метаноле) (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T(Ac) растворили в 1 мл смеси пиридин — 25% водный аммиак, 1:1, и поместили в термостат при 60°С. Через 4 ч смесь многократно упарили с абс. пиридином, растворили в 0,1 мл абс. пиридина и добавили 0,1 мл раствора *n*-хлорфенилфосфобистриазолида в 1,4-диоксане. Получение фосфорилирующего реагента описано в методике фосфорилирования (Tr)Tp'(Et)T (см. выше). Через 1 ч в смесь добавили 0,2 мл воды, упарили и экстрагировали 3×1 мл воды из 1 мл хлороформа. Хлороформный слой упарили, растворили в смеси хлороформ — метанол, 85:15 (0,5 мл), и хроматографировали на колонке (3×6 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол, 85:15. Выделено 40 ОЕ (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)Tp(ClPh) и 40 ОЕ непрореагировавшего (Tr)Tp''(Et)Tp(Et)Tp''(Et)T. Аналогично из 150 ОЕ (Tr)Tp'(Et)Tp(Et)Tp'(Et)T(Ac) получено 90 ОЕ (Tr)Tp'(Et)×Tp(Et)Tp'(Et)Tp(ClPh). Растворимость фосфорилированных тетраимидилатов в буфере метанол — 0,066 М трис-АсОН, 7:3 (рН 7,8) составляет ~15 ОЕ₂₆₆/мл.

Авторы выражают благодарность Н. И. Комаровой (НИОХ СО АН СССР) за анализ тетраимидилатов на хроматографе «Обь-4» и В. Ф. Ямщикову (НИОХ СО АН СССР) за предоставление модифицированной методики получения фосфорилирующего реагента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Karova G. G., Knorre D. G., Rytte A. S., Stephanovich L. E.* FEBS Lett., 1980, v. 122, № 1, p. 21—24.
2. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512—1522.
3. *Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 9, p. 1988—1996.
4. *Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е.* Докл. АН СССР, 1980, т. 255, № 1, с. 110—113.
5. *Jensen D. E., Reed D. J.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 24, p. 5098—5107.
6. *Miller P. S., Fang K. N., Kondo N. S., Ts'o P. O. P.* J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 24, p. 6657—6665.
7. *Pless R. C., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 6, p. 1239—1250.
8. *Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. B.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 9659—9665.
9. *Дроздова Л. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 1981, № 2, вып. 1, с. 125—130.

10. Reitz G., Pfeleiderer W. Chem. Ber., 1975, B. 108, № 9, S. 2878-2894.
11. Петренко В. Л., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431-435.
12. Kan L. S., Cheng D. M., Miller P. S., Yano J., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1980, v. 19, № 10, p. 2122-2132.
13. Wood D. J., Hruska F. E., Ogilvie K. K. Can. J. Chem., 1974, v. 52, p. 3353-3366.
14. Lee C. H., Sarma R. H. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 12, p. 3541-3548.
14. Stavinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu. R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
16. Лебедев А. В., Резвухин А. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149-185.
17. Ohtsuka E., Tozuka Z., Ikehara M. Tetrahedron Lett., 1981, v. 22, № 45, p. 4483-4486.
18. Drechworth M. L., Gait M. J., Goctet P., Hong G. F., Sing M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691-1706.

Поступила в редакцию
20.X.1982

После доработки
29.XII.1982

**INVESTIGATION OF NON-IONIC DIASTEREOMERIC ANALOGS
OF OLIGONUCLEOTIDES. SYNTHESIS AND SEPARATION
OF DIASTEREOMERS OF DI- AND TETRATHYMIDYLATE ETHYL ESTERS**

ABRAMOVA T. V., LEBEDEV A. V.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

(Tr)Tp(CiPh)T(Ac), (Tr)Tp(Et)T(Ac) and Tp(Et)T have been prepared and diastereomers of each dinucleotide have been separated by silica gel chromatography. Tetranucleotides (Tr)Tp(Et)Tp(Et)Tp(Et)T(Ac) and (Tr)Tp(Et)T(Et)Tp(Et)Tp(CiPh) have been prepared by condensation of the individual diastereomeric dinucleotides followed by transesterification of *p*-chlorophenyl group by ethyl group. Each of the tetranucleotides has been obtained as a mixture of two diastereomers due to the new internucleotide asymmetric phosphorous atom. These diastereomers have been separated with the aid of reversed-phase chromatography. The racemization has been shown to occur during transesterification of *p*-chlorophenyl group by ethyl one in the presence of CsF. Some physico-chemical properties (TLC, UV-, CD-, ¹H and ³¹P NMR spectra) of diastereomers have been studied.