

УДК 547.3+547.93

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ
РЕАКЦИИ В СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.

Изложены основные закономерности фосфорилирования нуклеозидов и других спиртов моно- и диэфирами фосфорной кислоты в присутствии наиболее широко используемых конденсирующих реагентов: арилсульфохлоридов, арилсульфоазолидов, карбодиимидов, смесей арилсульфохлорида с азолами и пиридинами. Обсуждены сведения о промежуточных соединениях и промежуточных реакциях в олигонуклеотидном синтезе, а также в модельных процессах, полученные в основном с использованием спектроскопии ЯМР ^{31}P .

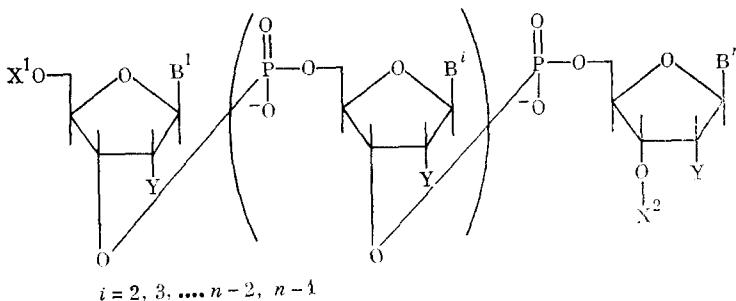
Библиография — 67 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	313
II. Основные стадии фосфоэфирных конденсаций	314
III. Взаимодействие Р-компоненты с конденсирующими реагентами	317
IV. Пиридиневые производные и азолиды фосфоэфиров	322
V. Механизм фосфодиэфирных конденсаций	326
VI. Механизм фосфотриэфирных конденсаций	332

I. ВВЕДЕНИЕ

Олигонуклеотиды общей структуры



(X^1 и X^2 —Н или $\text{O}-\text{P}(\text{O})\text{O}-$, $Y=\text{H}$ или OH , B —азотистые гетероциклические, чаще всего аденин, гуанин, цитозин, урацил и тимин) являются фрагментами важнейшего класса биополимеров — нуклеиновых кислот: ДНК, если $X=\text{H}$, или РНК, если $Y=\text{OH}$. Их химический синтез является одной из центральных задач биоорганической химии. Олигонуклеотиды являются промежуточными олигомерами при химико-ферментативном синтезе генетического материала. Непрерывно возрастает их роль как инструмента исследования в молекулярной биологии и генной инженерии.

Основная и многократно повторяющаяся стадия в любом методе олигонуклеотидного синтеза — образование новой фосфоэфирной (межнуклеотидной) связи между мономерами или промежуточными олигомерами. До последнего времени основные успехи в синтезе олигонуклеотидов достигнуты с помощью фосфоэфирных конденсаций, т. е. с использованием реакции между оксигруппой одного компонента (OH -компонент) и фосфатной группой, другого (Р-компонент), протекающей в присутствии конденсирующих реагентов. В качестве таковых наиболее широкое применение нашли арилсульфохлориды (ArSO_2Cl) и арилсульфоазолиды (тетразолиды — ArSO_2Tet и 3-нитро-1,2,4-триазолиды — ArSO_2NTr).

В начальный период становления химии олигонуклеотидов широко использовался дициклогексилкарбодиимид. Для образования фосфоэфирных связей успешно применяются также реагенты окислительно-восстановительной конденсации, главным образом смесь трифенилфосфина и 2,2-дипиридилилдисульфида.

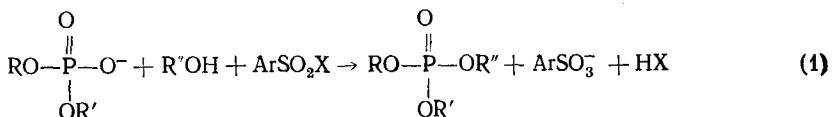
Первые серьезные успехи в становлении химического синтеза олигонуклеотидов связаны с развитием так называемого фосфодиэфирного метода синтеза, при котором Р-компонент является фосфомоноэфиром, а продукт конденсации — фосфодиэфиром. Этим путем в работах Корана и сотр. [1, 2] осуществлены первые синтезы генов, причем в качестве конденсирующих реагентов использовались дициклогексилкарбодиимид и арилсульфохлориды. Однако в конце 70-х годов произошел резкий поворот в сторону фосфотриэфирного метода синтеза, в котором Р-компонент является диефиром, а продукт конденсации — триэфиром. В последнем случае межнуклеотидный фосфат блокирован той или иной защитной группой, например, *n*-хлорфенилом. Несмотря на необходимость удалять на последней стадии блокирующие группы с межнуклеотидных фосфатов, в целом это привело к существенному упрощению и ускорению процедуры синтеза за счет ускорения промежуточных конденсаций и упрощения очистки промежуточных олигомеров. Переход к фосфотриэфирному методу стал эффективен в результате появления новых конденсирующих реагентов — арилсульфоазолидов [3—8] и смесей арилсульфохлоридов с нуклеофильными катализаторами — тетразолом [6], 3-нитро-1,2,4-триазолом [9, 10], диметиламинопиридином [11—13] и N-метилимидазолом [10, 14—19].

Важное значение фосфоэфирных конденсаций в химии олигонуклеотидов обусловило интерес к изучению их механизма. Ряд гипотез о природе промежуточных частиц, участвующих в этих процессах, высказывался основоположниками химии нуклеиновых кислот — Тоддом, Михельсоном, Корана. Систематические исследования стали возможными с появлением метода импульсной спектроскопии ЯМР ^{31}P , который позволяет наблюдать за ходом фосфоэфирных конденсаций путем регистрации накопления основных и побочных продуктов и некоторых промежуточных соединений.

Цель данного обзора — изложить современные представления о механизме образования фосфоэфиров с помощью конденсирующих реагентов; эти представления в значительной мере основаны на исследованиях промежуточных соединений и промежуточных реакций в олигонуклеотидном синтезе, выполненных авторами данного обзора и их сотрудниками.

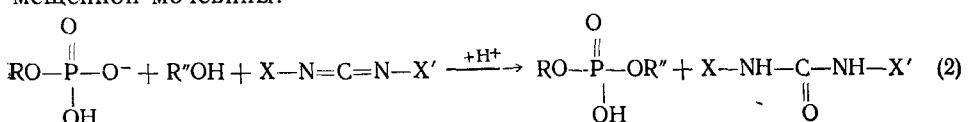
II. ОСНОВНЫЕ СТАДИИ ФОСФОЭФИРНЫХ КОНДЕНСАЦИЙ

Фосфоэфирные конденсации представляют собой сопряженные реакции образования фосфоэфиров и превращений конденсирующих реагентов. В случае арилсульфохлоридов и арилсульфоазолидов таким превращением является гидролиз конденсирующего реагента, и общее уравнение конденсации можно записать в виде:

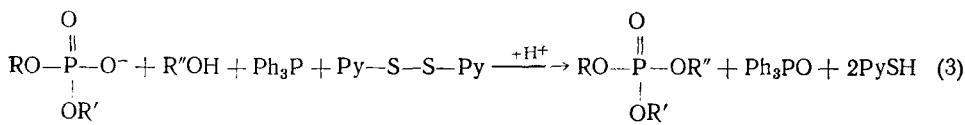


$\text{X} = \text{Cl}$, остаток тетразола или 3-нитро-1,2,4-триазола.

В случае дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и других дизамещенных карбодиимидов помимо образования фосфодиэфира происходит гидратация конденсирующего реагента с образованием соответствующей дизамещенной мочевины:

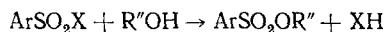


(в случае ДЦК $X, X' =$ цикло- C_6H_{11}). При окислительно-восстановительной конденсации происходит восстановление одного и окисление другого компонента пары, например:



В схемах (1) и (3) $\text{R}' = \text{H}$ (в случае фосфодиэфирной конденсации) или является каким-либо органическим радикалом (при фосфотриэфирной конденсации). В зависимости от используемых растворителей ионы могут существовать в виде отдельных частиц или в виде ионных пар; здесь и ниже они изображаются без соответствующих противоионов.

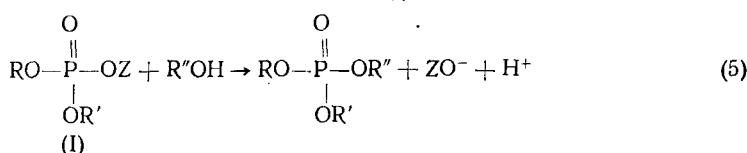
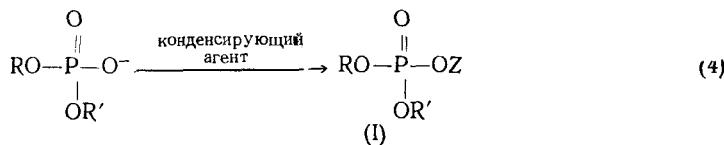
В соответствии с общими представлениями о механизме сопряженных реакций [20], реакции (1)–(3) должны проходить через образование промежуточных соединений, которые возникают при взаимодействии конденсирующего реагента (выступающего в роли индуктора) с одним из конденсируемых компонентов. Принято считать, что это взаимодействие происходит с Р-компонентом. В пользу такой точки зрения свидетельствует способность всех перечисленных выше конденсирующих реагентов вступать в реакцию с Р-компонентом в отсутствие OH^- -компонента. В то же время эти конденсирующие реагенты либо вообще не реагируют с OH^- -компонентом в условиях фосфоэфирных конденсаций, как то имеет место в случае дициклогексилкарбодиимида, либо дают заведомо побочные продукты. Так, арилсульфохлориды и арилсульфоазолиды сульфонилируют OH^- -компонент по реакции:



Однако до сих пор продукты непосредственного взаимодействия перечисленных выше конденсирующих реагентов с Р-компонентами ни в одном случае зарегистрировать не удалось; регистрируются лишь продукты их дальнейшего превращения.

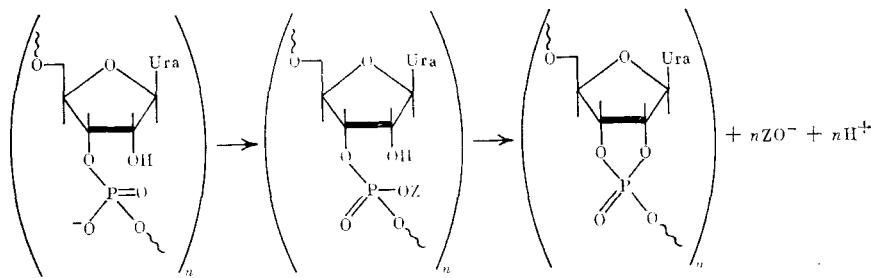
Таким образом, первый вопрос, который встает при изучении механизма фосфоэфирных конденсаций — это вопрос о природе активных промежуточных частиц, образующихся непосредственно при взаимодействии молекул конденсирующего реагента и Р-компонента, а также о механизме этого взаимодействия (см. гл. II).

Предполагается [21], что образующиеся частицы являются сильными электрофилами, способными фосфорилировать OH^- -группы (Z — фрагмент конденсирующего агента):



В качестве примера процесса, в ходе которого первичные продукты взаимодействия фосфата с конденсирующим реагентом в основном расходуются в реакции с OH^- -группами, можно привести действие конденсирующих реагентов — триизопропилбензосульфохлорида (ТПС) и ДЦК на цетавлоновую соль полиуридиловой кислоты в диметилформамиде [22]. В обоих случаях в спектрах ЯМР ^{31}P регистрируется исчезновение сигналов межнуклеотидного фосфата и появление существенно смещенных в слабое поле сигналов циклофосфотриэфирных групп в со-

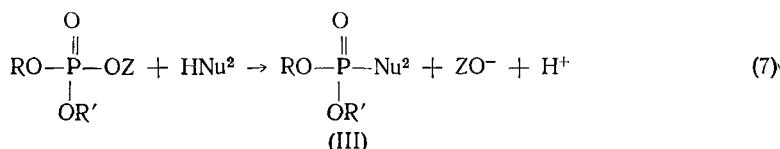
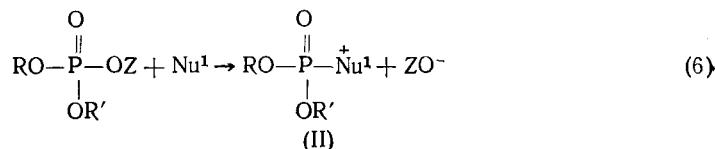
ответствии с превращением по схеме:



Пространственная близость фосфата и 2'-оксигруппы благоприятствует протеканию реакций (5), которая в этом случае является внутримолекулярной.

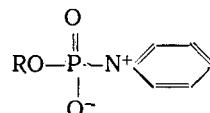
Однако в условиях образования межнуклеотидных связей столь простая схема фосфоэфирной конденсации не реализуется. В этом случае реакция частиц (I) с молекулами OH-компонента является межмолекулярной, а в системе присутствуют другие нуклеофилы, более сильные, чем OH-компонент [2].

В числе нуклеофилов, конкурирующих с OH-компонентом за реакцию с соединением (I), в первую очередь следует упомянуть пиридин, который до самого недавнего времени применялся в качестве растворителя [21] практически при всех фосфоэфирных конденсациях, а также некоторые другие азотистые гетероциклы, которые в последние годы стали использовать для ускорения фосфоэфирных конденсаций — тетразол, 3-нитро-1,2,4-триазол, N-метилимидазол, 4-NN-диметиламинопиридин (ДМАП). Можно ожидать, что в их присутствии реакция преимущественно пойдет по следующему пути:



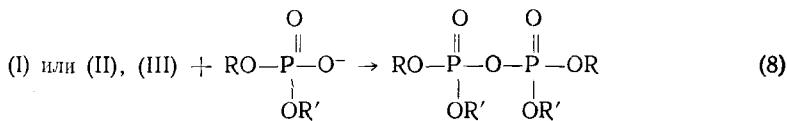
(Nu^1 — пиридин, 4,4-диметиламинопиридин, N-метилимидазол; HNu^2 — тетразол, 3-нитро-1,2,4-триазол; R' — H, Ar; R — остаток защищенного нуклеозида).

Соединения (II) и (III) должны быть достаточно сильными фосфорилирующими реагентами, первые — благодаря положительному заряду на атоме N, вторые — в результате достаточно сильных электроноакцепторных свойств колец тетразола и нитротриазола. На возможную роль фосфорилпиридиневых производных структуры



в качестве промежуточных соединений при фосфоэфирной конденсации указывал Микельсон [21]. Поэтому второй кардинальный для понимания механизма фосфоэфирных конденсаций вопрос — это вопрос о роли соединений типа (II) и (III) в образовании новых фосфоэфирных связей, в первую очередь об их реакционной способности по отношению к спиртам. Имеющиеся по этому поводу данные будут рассмотрены ниже (в гл. III).

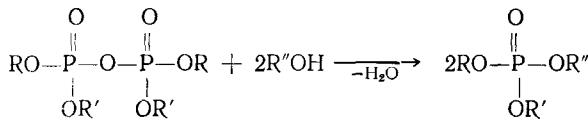
Наряду с упомянутыми гетероциклическими нуклеофилами в начальной фазе процесса в реакционной смеси присутствует непрореагировавший Р-компонент, который также является нуклеофилом, как правило, более сильным, чем ОН-компонент. Взаимодействие молекул Р-компонента с частицами (I)–(III) приводит к их расходованию с образованием пирофосфата



препятствуя тем самым образованию новых фосфоэфирных связей. В случае фосфотриэфирной конденсации при этом образуется пирофосфотетраэфир, лишенный нуклеофильных свойств. Интенсивное фосфорилирование ОН-компонента возможно лишь после полного израсходования Р-компонента по реакции (8).

В случае фосфодиэфирной конденсации ситуация существенно усложняется тем, что нуклеофилами являются не только исходный Р-компонент, но и образующийся из него по реакции (8) пирофосфодиэфир и даже целевой продукт реакции — фосфодиэфир. Для эффективного фосфорилирования ОН-компонента необходимо, чтобы исчерпались как сам Р-компонент, так и все его нуклеофильные производные. Эти реакции описываются в главе IV при рассмотрении общего механизма фосфодиэфирной конденсации.

Как видно на простейшем примере реакции (8), в первой фазе процесса активные производные типы (II) и (III) в первую очередь расходуются на реакцию с Р-компонентом. Во второй фазе процесса, в которой в основном и происходит образование новых межнуклеотидных связей, частицы (II) и (III) регенерируются из пиро- и полифосфатов. Для этого необходимо участие азотистых гетероциклов, которые не конкурируют с ОН-компонентом за (II) и (III), так как их взаимодействие с (II) или (III) является обменным процессом и не приводит к расходованию последних. Кроме того, в этом процессе может принимать участие и конденсирующий реагент. Например, как следует из стехиометрического уравнения реакции пирофосфодиэфира или пирофосфотетраэфира с ОН-компонентом

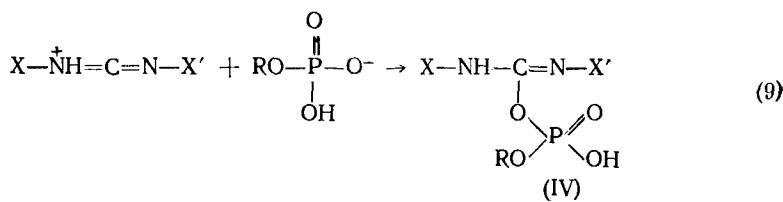


для полного превращения нужно связать молекулу воды, т. е. необходимо участие конденсирующего реагента.

Механизмы регенерации соединений (II) и (III) также существенно различны в случае фосфоди- и фосфотриэфирной конденсации; они будут рассмотрены отдельно в главах IV и V.

III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Р-КОМПОНЕНТА С КОНДЕНСИРУЮЩИМИ РЕАГЕНТАМИ

Согласно Корана [23–25], в случае дизамещенных карбодиимидов — первых конденсирующих реагентов, широко введенных в практику олигонуклеотидной химии — первичным продуктом взаимодействия Р-компонента с конденсирующим реагентом является соответствующая О-фосфорилизомочевина (IV). Поскольку фосфорилирование в присутствии карбодиимидов подавляется сильно основными аминами, было высказано предположение, что реакция проходит между протонированной формой карбодиимида и арионом фосфоэфира [21, 23–26].



Однако ни выделить, ни даже зарегистрировать в реакционной смеси соединение (IV) не удалось. Первичным продуктом, который может быть выделен из реакционной смеси, является пирофосфат. Дальнейшее превращение в случае фосфомоноэфиров приводит к накоплению тризамещенного триполифосфата [26]. Этот результат впоследствии был воспроизведен в работах [27—29] при наблюдении за ходом реакции между 3'-ацетилтимидин-5'-фосфатом и дициклогексилкарбодиимидом в

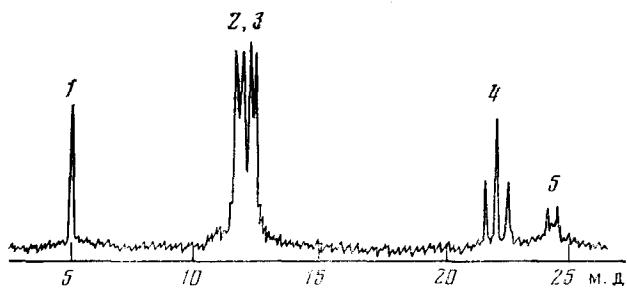
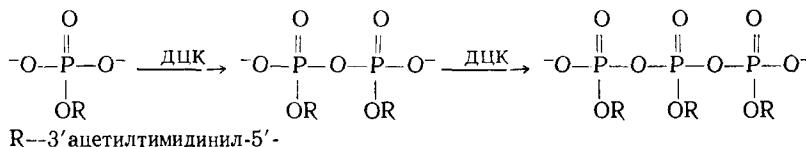
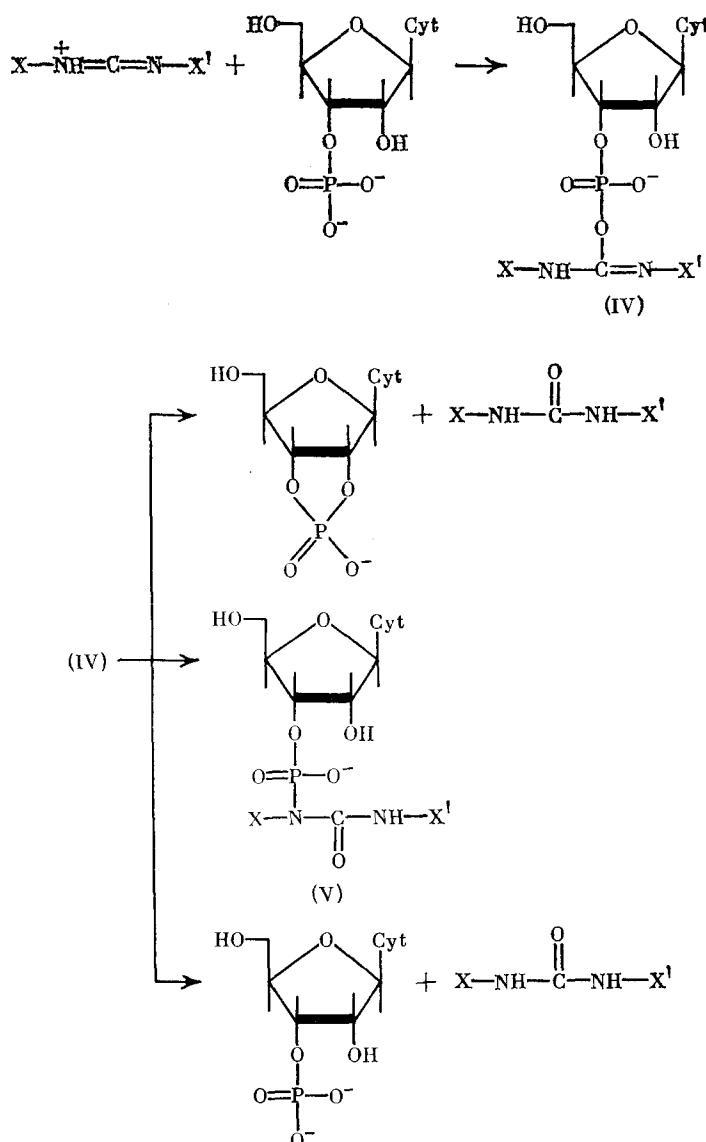


Рис. 1. Спектр ЯМР ^{31}P реакционной смеси, полученной при взаимодействии 0,15 M рТ(Ас) с 1,5 M ДЦК в пиридине через 1 ч после начала реакции: 1 — сигнал пиридиниевого производного рТ(Ас); 2, 4 — сигналы концевых атомов фосфора тринуклеозидтриполифосфата и тетрануклеозидтетраполифосфата; 4 — сигналы среднего атома фосфора тринуклеозидтриполифосфата; 5 — сигналы средних атомов фосфора тетрануклеозидтетраполифосфата [37]

пиридине с помощью ЯМР ^{31}P , поскольку химические сдвиги образующихся соединений, а в случае типолифосфата — и структура спектра, существенно отличаются, и за поведением каждого компонента реакционной смеси можно следить по отдельности (рис. 1, 2).



Кинетическая проверка механизма (9) была проведена [30] на примере реакции цитидин-2'(3')-монофосфата (ЦМФ) с водорастворимым карбодиимидом — *n*-толуолсульфонатом N-циклогексил- N' - β -(4-метилморфолиний) этилкарбодиимидом (далее сокращенно ЦМЭ-карбодиимид) в водном растворе. В этом случае продуктом реакции является в основном цитидин-2',3'-циклофосфат (цЦМФ), по-видимому, образующийся непосредственно из активного промежуточного соединения (IV) в результате пространственной близости активированного фосфата и 2'-оксигруппы. Образование пирофосфата в этом случае не наблюдается. Зарегистрировано накопление некоторого количества N-цитидилил-ЦМЭ-мочевины (V), которая может рассматриваться как продукт изомеризации О-цитидилил-ЦМЭ-изомочевины (IV) [30]. Существенно, что скорость расходования ЦМЭ-карбодиимида намного превосходит скорость накопления продуктов превращения ЦМФ. Это свидетельствует о том, что при реакции ЦМЭ-карбодиимида с ЦМФ образуется некоторое промежуточное соединение, которое наряду с превращением в цЦМФ и (V) может гидролизоваться с образованием исходного ЦМФ. Полную схему процесса в свете механизма Корана можно представить следующим образом:



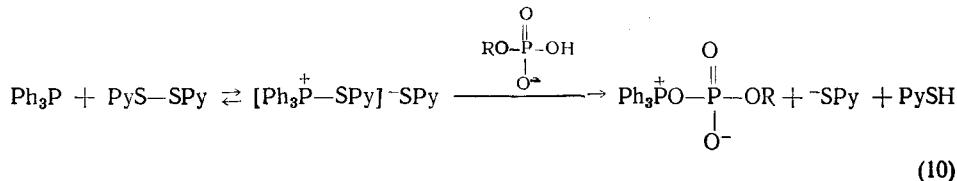
Расходование ЦМЭ-карбодиимида протекает как реакция первого порядка по обоим компонентам, причем эффективная константа скорости реакции зависит от pH и скорость реакции пропорциональна произведению концентраций протонированной формы ЦМЭ-карбодиимида и дважды ионизированной формы ЦМФ [30].

При реакции ЦМЭ-карбодиимида в водном растворе с нуклеозид-5'-фосфатами при невысоких концентрациях последних, в отличие от реакции с нуклеозид-2'(3')-ЦМФ, гидратация карбодиимида является главным направлением процесса [31]. В работе [32] показано, что при взаимодействии аденоzin-5'-монофосфата, меченного ^{18}O по фосфатной группе, с ДНК в пиридине в присутствии значительного избытка H_2^{18}O меченный кислород практически количественно переходит в состав образующейся дициклогексимочевины. Это также является определенным свидетельством в пользу промежуточного образования соединения типа (IV).

Таким образом, все имеющиеся данные согласуются с механизмом, предложенным в работах [23—26], т. е. с первичным образованием О-fosфорилизомочевины.

Для конденсации в присутствии пары трифенилфосфин — дипиридилидисульфид предложен следующий механизм образования активных фос-

форилирующих частиц [33, 34]:



Первичным продуктом регистрируемым ЯМР ^{31}P в случае 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата, как и в случае карбодимидов, является соответствующий пирофосфат, который далее превращается в триполифосфат [35]. При смешении дипиридилилдисульфида с трифенилфосфином никаких изменений в спектре ЯМР ^{31}P реакционной смеси не наблюдается. Это означает, что если процесс идет по схеме (10), то равновесие на первой стадии сильно смещено влево. Детально процесс не исследовался.

Наиболее обстоятельно исследована первая фаза фосфоэфирной конденсации для арилсульфохлоридов и арилсульфоазолидов. Как в случае

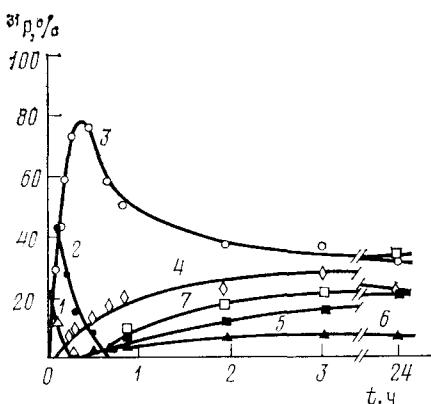
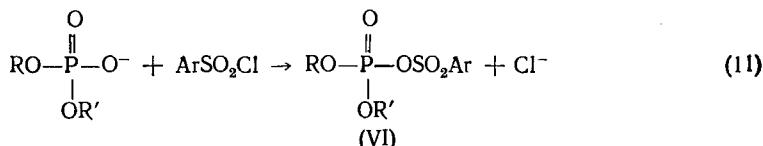


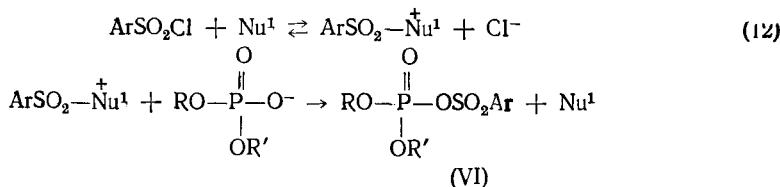
Рис. 2. Кинетические кривые взаимодействия 0,15 M pT(Ac) с 1,5 M ДЦК в пиридине: 1 — исходный мононуклеотид; 2 — динуклеозидпирофосфат; 3 — тринуклеозидтриполифосфат; 4 — тетрануклеозидтетраполифосфат; 5 — N-пиросфофорилмочевина; 6 — пиридиневое производное pT(Ac); 7 — неидентифицированный продукт [37]

фосфодиэфирной, так и в случае фосфотриэфирной конденсации продуктом взаимодействия исходного Р-компоненты с конденсирующим реагентом является соответствующий пирофосфат [17, 27—29, 36—43]. При взаимодействии фосфомоногида с ArSO_2Cl образующийся пирофосфодиэфир реагирует с образованием тризамещенного триполифосфата. Дальнейшие превращения последнего будут рассмотрены в следующей главе. Кинетика первичной реакции с ТПС была изучена на примере реакции 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата pT(Ac) и Р¹, Р²-бис(3'-О-ацетилтимидинил-5')пирофосфата в пиридине. В обоих случаях реакция имеет первый порядок по ТПС и по Р-компоненту, что доказывает участие только одной молекулы Р-компонента в лимитирующей стадии. Это находится в полном согласии с предположением, высказанным Корби, Тоддом и Корана [44—46], согласно которому первичным продуктом взаимодействия арилсульфохлоридов с фосфатами является смешанный ангидрид фосфата и арилсульфокислоты, образующийся по реакции:



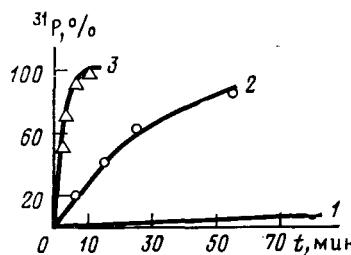
Однако реакция (11) является сложной и требует участия нуклеофильного катализатора [18]. На примере реакции *n*-хлорфенилового эфира 3'-О-левулинилтимидин-5'-фосфата, $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{PT}(\text{Lev})$ с триизопропилбензольсульфохлоридом в смеси хлороформ — ацетонитрил (7 : 1) было показано, что образование пирофосфата не регистрируется при 30° в течение двух часов, в то время как в пиридине процесс заканчивается

в течение нескольких минут. Как видно из рис. 3, процесс значительно ускоряется при добавлении небольшого (по сравнению с ТПС) избытка пиридина и в еще большей степени при добавлении *N*-метилимидазола; добавление таких же количеств триэтиламина приводит лишь к несущественному накоплению пирофосфата. Именно в таком порядке изменяется нуклеофильность этих трех аминов. Таким образом, при образовании смешанного ангидрида (VI) значительную роль играет нуклеофильный катализ. Реакция, по-видимому, протекает по следующей схеме:



В соответствии с этим предположением, в смеси ТПС или тозилхлорида с диметиламинопиридином, также широко использующимся в качестве

Рис. 3. Кинетические кривые образования тетразамещенного пирофосфата при реакции 0,1 *M* $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{PT}(\text{Lev})$ (триэтиламмониевая соль) и 0,2 *M* ТПС в хлороформе при 30°С в присутствии: 1 — 0,4 *M* триэтиламина, 2 — 0,4 *M* пиридина, 3 — 0,4 *M* *N*-метилимидазола [18]



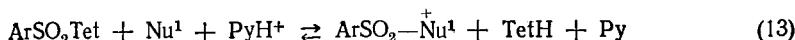
нуклеофильного катализатора, в хлористом метилене методом ИК-спектроскопии зарегистрировано образование арилсульфодиметиламинопиридиниевого производного, которое, по-видимому, стабилизировано за счет образования хиноидной структуры [47].



В случае пиридинина и *N*-метилимидазола такого производного зарегистрировать не удалось, скорее всего из-за того, что равновесие (12) сильно смещено влево. Таким образом, арилсульфохлориды оказались недостаточно сильными электрофилами, чтобы непосредственно взаимодействовать со слабо нуклеофильным анионом фосфодиэфира, по крайней мере, в растворителях с низкой диэлектрической постоянной.

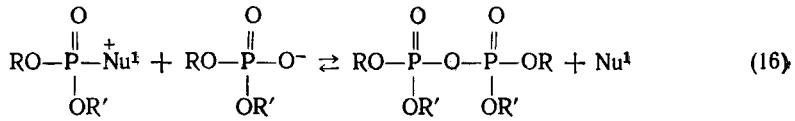
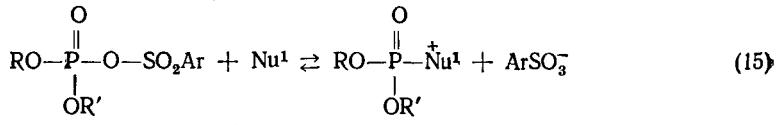
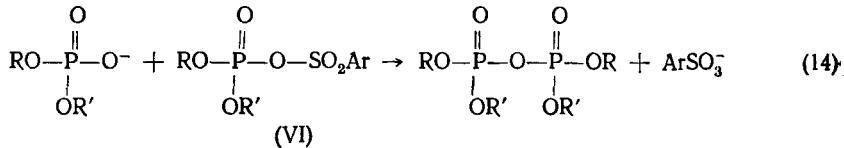
По-видимому, с более нуклеофильными фосфомоноэфирами в более полярных растворителях такое взаимодействие становится возможным. Так, $\text{PT}(\text{Ac})$ реагирует с ТПС в диметилформамиде. Однако добавление пиридинина существенно ускоряет реакцию [48].

В случае арилсульфоазолидов — тетразолида и 3-нитро-1,2,4-триазолида регистрируемым продуктом взаимодействия с Р-компонентом также является соответствующий пирофосфат [17, 40—43]; по аналогии с реакцией арилсульфохлоридов можно предполагать, что первичным продуктом взаимодействия является тот же смешанный ангидрид (VI). В хлористом метилене взаимодействие $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{PT}(\text{Lev})$ с *n*-толуолсульфотетразолидом идет медленно и существенно ускоряется при добавлении пиридинина [43]. Можно полагать, что и в этом случае фосфодиэфир сульфонилируется с помощью арилсульфопиридиниевого производного. Образование пирофосфата в пиридине при реакции TsTet с $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{PT}(\text{Ac})$ существенно ускоряется при добавлении толусульфокислоты и практически полностью блокируется при добавлении избытка триэтиламина [41]. Эти эффекты хорошо согласуются со стехиометрическим уравнением образования арилсульфопиридиниевого производного:



Равновесие (13) должно смещаться влево при добавлении сильного амина и вправо — при добавлении кислоты.

Образование смешанного ангидрида (VI) является лимитирующей стадией процесса образования пирофосфата. Поэтому кинетические измерения не позволяют высказаться определенно по поводу механизма дальнейшего превращения (VI) в пирофосфат. Оно может происходить либо в результате прямого взаимодействия (VI) со второй молекулой Р-компоненты (уравнение (14)) [13, 43], либо через предварительное образование фосфорилпиридиниевого или фосфорилазолиевого производного (уравнения (15), (16)), как постулировано в работах [6, 9, 10, 16];



Резкое ускорение образования смешанного ангидрида (VI) в присутствии пиридинина и N-метилимидазола выше было интерпретировано как результат существенно более быстрого протекания реакции (12) по сравнению с прямой реакцией (11). Это означает, что указанные амины существенно активнее, чем анион фосфоэфира, атакуют тетраэдрический атом серы в ArSO_2Cl . Логично предположить, что качественно такое же соотношение скоростей имеет место при атаке тех же нуклеофилов на тетраэдрический атом фосфора в (VI), т. е. реакция (15) существенно преобладает над реакцией (14) и основной путь образования пирофосфата проходит через стадии (15), (16).

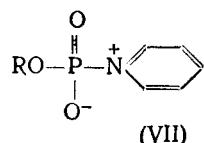
В случае фосфомоноэфиров образование пирофосфата и дальнейшее превращение в тризамещенный триполифосфат и более длинные полифосфаты происходят при действии ArSO_2Cl в диметилформамиде в отсутствие нуклеофильных катализаторов. Однако добавление пиридинина существенно ускоряет процесс, т. е. и в случае реакции с фосфомоноэфирами арилсульфопиридиний является более сильным сульфонилирующим реагентом, чем ArSO_2Cl .

IV. ПИРИДИНИЕВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И АЗОЛИДЫ ФОСФОЭФИРОВ

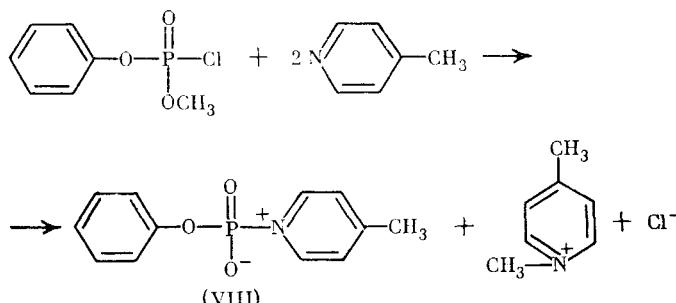
Наиболее детальные сведения о роли производных типа (II) как активных промежуточных соединений, фосфорилирующих оксигруппы OH-компонента, были получены при изучении фосфодиэфирной конденсации в пиридине.

При обработке фосфомоноэфиров (нуклеозид-5'-фосфаты, фенилфосфат, нитрофенилфосфат и др.) избытком ТПС [27—29] или сшитым полистиролсульфохлоридом в пиридине [49] по спектрам ЯМР ^{31}P регистрируется практически количественное превращение эфиров в производные, спектр которых представлен синглетом, смешанным на ~ 5 м. д. в сильное поле по сравнению с исходным эфиром. Подробные данные по химическим сдвигам и структуре спектров ЯМР ^{31}P эфиров фосфорной кислоты и их производных представлена в работе [50]. Такое же превращение претерпевают нуклеозид-5'-фосфаты при обработке их избытком смеси трифенилфосфина и дипиридилидисульфида в пиридине [35, 51, 52]. Сравнительно небольшое изменение величины химического сдвига при образовании этих производных свидетельствует о сохранении тетраэдрической конфигурации атома фосфора. Необходимость присутствия пири-

дина для их образования позволяет предположить, что они являются фосфорилпиридиниевыми производными структуры (VII):

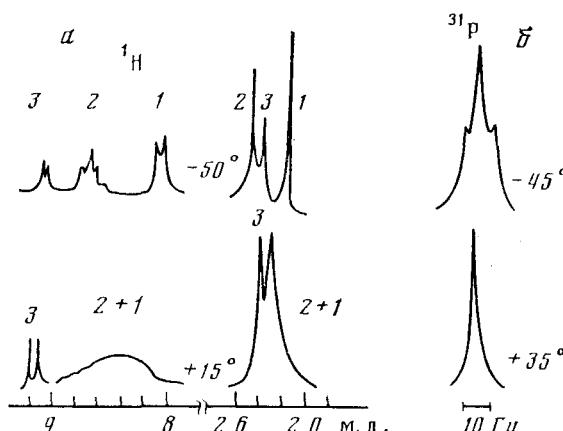


Прямое доказательство этой структуры найдено для производного фенилфосфорной кислоты (VIII), которое с этой целью было получено по реакции [52, 53]:



В спектрах ЯМР при -50° регистрируется расщепление как сигнала ^{31}P на α -протонах пиколиниевого остатка, так и сигнала ^1H α -протонов на ядре фосфора ($^3J_{\text{PNCH}} = 5,5$ Гц). Этим доказывается наличие химической связи между атомами Р и остатком γ -пиколина. Химические сдвиги как для α -протонов, так и для протонов γ -метильной группы смешены в слабое поле по сравнению с самим пиколином, что обусловлено появлением положительного заряда вблизи пиколинового фрагмента. При повышении температуры наблюдается обмен между свободным пиколином и

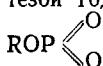
Рис. 4. *a* — Структура сигналов ЯМР ^1H α -протонов и γ -метильных групп: 1 — γ -пиколина, 2 — соединения (VIII), 3 — N-метил- γ -пиколиния, в зависимости от температуры; *б* — структура сигналов ЯМР ^{31}P соединения (VIII) в зависимости от температуры. Спектры записаны через 1,5 ч после начала реакции фенилметилхлорфосфата с 2 экв. γ -пиколина в хлористом метилене при комнатной температуре [52]



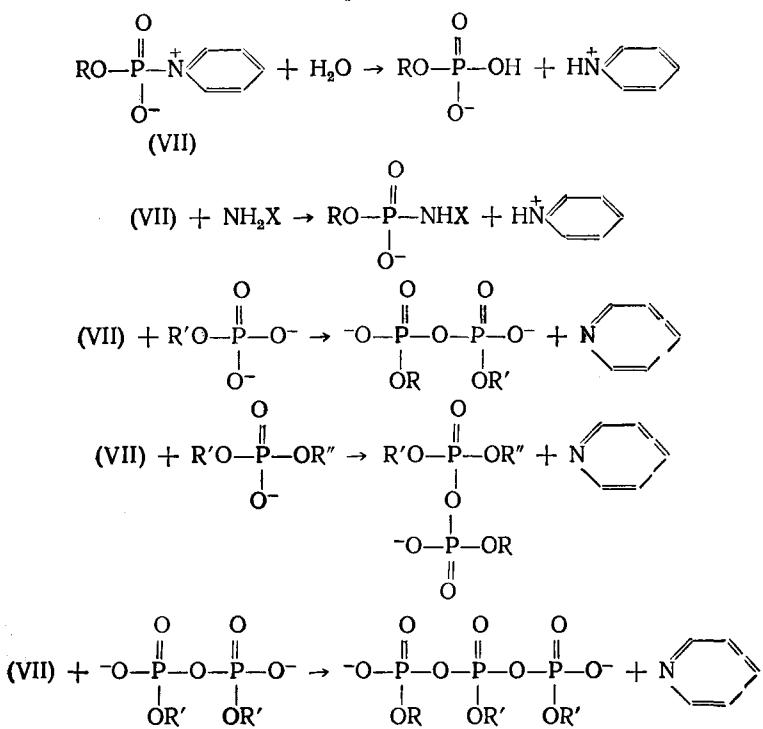
производным, что приводит к слиянию сигналов как α -, так и γ -метильных протонов (рис. 4) в спектрах свободного пиколина и соединения (VIII), а также к исчезновению расщепления сигнала ЯМР ^{31}P на α -протонах¹.

Соединение (VII) при комнатной температуре активно реагирует с водой, аминами, фосфомоно- и фосфодиэфирами, замещенными пирофос-

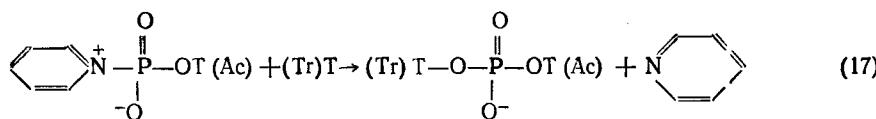
¹ Отсутствие такого расщепления в условиях проведения фосфоэфирных конденсаций при комнатной температуре в избытке пиридина не позволило в первых работах, посвященных изучению образования и превращений (VII), отдать предпочтение структуре (VII), предложенной Микельсоном [21], и это соединение в соответствии с гипотезой Тодда [45] и Корана [26, 54] фигурировало как соответствующий метаfosфат



фатами, причем все реакции заканчиваются менее чем за 1—2 мин (время, необходимое для записи спектра ЯМР ^{31}P).

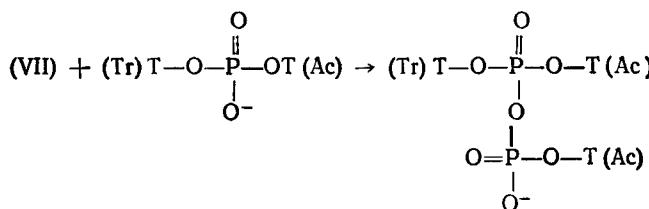


Несколько медленнее происходит реакция со спиртами. В этом случае удается с помощью ЯМР ^{31}P получить кинетическую кривую расходования (VII) и определить константу скорости. Для реакции (17)



она составляет $7,3 \cdot 10^{-3}$ л/моль·с при 30° и $0,8 \cdot 10^{-3}$ моль·с при 2° [51]. Константа скорости существенно зависит от природы OH-компонента, что свидетельствует о протекании процесса по ассоциативному механизму. Так, для реакции того же производного при 2° с этиленциангидрином константа скорости равна $11,3 \cdot 10^{-3}$ л/моль·с [51].

При реакции (VII) со спиртами по спектрам ЯМР ^{31}P регистрируется накопление не фосфодиэфира, а пирофосфотриэфира, продукта взаимодействия образовавшегося фосфодиэфира с еще одной молекулой (VII).



Пирофосфотриэфиры имеют два неэквивалентных атома фосфора, причем один из них — асимметрический; в спектре ЯМР ^{31}P обнаруживается сложный сигнал, представляющий собой наложение сигналов двух спиновых систем AB для двух диастереоизомеров [55, 56] (рис. 5).

Тетразолиды фосфомоноэфиров, как было показано на примере Р-тетразолида рТ(Ac), по крайней мере на два порядка менее реакционноспособны, чем аналогичное производное типа (VII) [13].

Вопрос о реакционной способности соединений типа (II) и (III) производных фосфодиэфиров был изучен [11, 12, 40—43] на модельных системах — производных дифенилфосфорной кислоты, полученных действием соответствующих гетероциклов на дифенилхлорфосфат. В качестве примера соединения типа (II) было выбрано 4-N,N-диметиламинопиридиниевое производное. При действии ДМАП на $(\text{PhO})_2\text{POCl}$ в хлористом метилене в спектре ЯМР ^{31}P исчезает сигнал исходного соединения и появляется сигнал, который расщепляется при -40° на α -протонах диметиламинопиридиниевого фрагмента [11]. В спектре ЯМР ^1H сигналы H_α , H_β и CH_3 -групп смешены в слабое поле по сравнению с соответствующими сигналами ДМАП, что обусловлено появлением в ДМАК-фрагменте

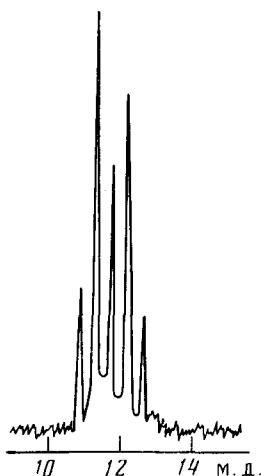


Рис. 5

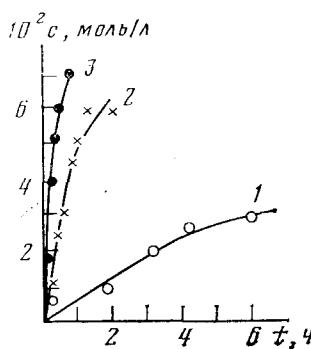
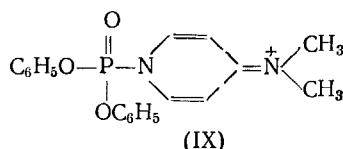


Рис. 6

Рис. 5. Спектр ЯМР ^{31}P пирофосфатриэфира, полученного при взаимодействии $0,0075 \text{ M}$ (Tr)T с $0,15 \text{ M}$ пиридиниевым производным (VII) через 80 мин после начала реакции [29]

Рис. 6. Кинетические кривые накопления фосфотриэфира (Tr)TOP(O)(OPh)₂ при взаимодействии $0,08 \text{ M}$ тетразолида дифенилфосфорной кислоты с $0,01 \text{ M}$ (Tr)T в диоксане при 30°C : 1 — без добавок, 2 — в присутствии $0,04 \text{ M}$ пиридина, 3 — в присутствии $0,04 \text{ M}$ γ -коксиллина [57]

те положительного заряда. Это позволило идентифицировать образующиеся соединения как дифенилфосфорилдиметиламинопиридиний, по-видимому, имеющий хиноидную структуру (IX).



Соединение (IX) чрезвычайно реакционноспособно по отношению к спиртам. Так, добавление этиленциангирида приводит к практически мгновенному превращению в 2-цианэтилдифенилфосфат [11].

Следует подчеркнуть, что аналогичные производные фосфомоноэфиров существенно менее реакционноспособны по отношению к спиртам, чем пиридиниевые производные [11—13]. Большая стабильность производных ДМАП связана как с более высокой основностью его по сравнению с пиридином, так и с возможностью дополнительной стабилизации путем образования хиноидной структуры. Резкое повышение реакционной способности при переходе от диметиламинопиридиниевых производных фосфомоноэфиров к производным фосфодиэфиров обусловлено тем, что пер-

вые являются цвиттер-ионами, а вторые несут положительный нескомпенсированный заряд.

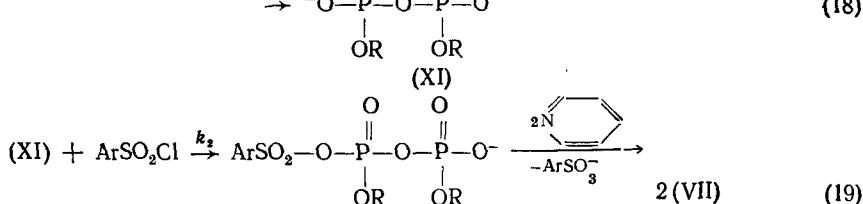
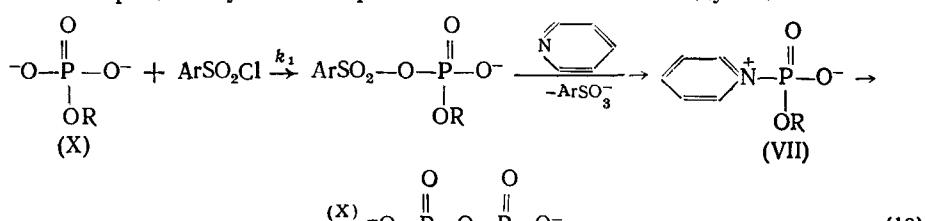
В качестве примера соединений типа (III) был выбран дифенилфосфотетразолид. При обработке дифенилхлорфосфата в диоксане тетразолом в присутствии триэтиламина после отделения выпавшего в осадок хлористого триэтиламмония в спектре ЯМР ^{31}P регистрируется сигнал при 21,5 м. д., существенно отличный от сигнала исходного вещества (5,5 м. д.) [41]. Положение сигнала позволяет идентифицировать образующееся соединение как дифенилфосфотетразолид [50]. Добавление (Tr) Т в качестве OH-компоненты к реакционной смеси приводит к превращению тетразолида дифенилфосфорной кислоты в соответствующий фосфотриэфир (Tr) $\text{TOP}(\text{O})(\text{OPh})_2$. В отсутствие оснований реакция протекает довольно медленно. Как видно из данных, приведенных на рис. 6, реакция существенно ускоряется при добавлении пиридина и в еще большей мере — при добавлении более основного γ -коллидина. Добавление триэтиламина приводит к практически мгновенному превращению тетразолида фосфодиэфира в фосфотриэфир [41, 57].

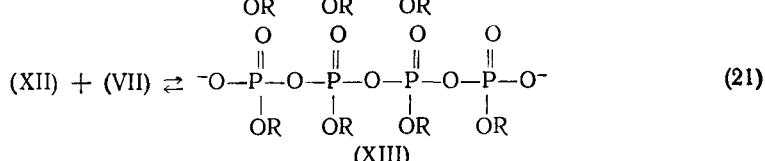
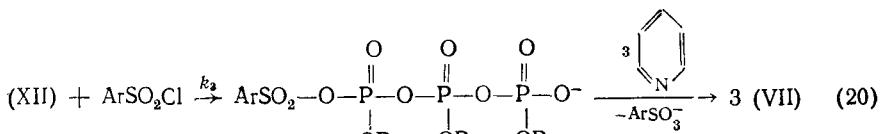
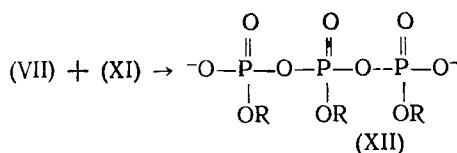
Таким образом, частицы типа (II) и (III) весьма реакционноспособны по отношению к спиртам, и, тем самым, есть основание рассматривать их как непосредственные предшественники новых фосфоэфирных групп при фосфоэфирных конденсациях.

V. МЕХАНИЗМ ФОСФОДИЭФИРНЫХ КОНДЕНСАЦИЙ

Наиболее детально механизм фосфодиэфирных конденсаций изучен в случае использования триизопропилбензолсульфохлорида в качестве конденсирующего реагента. Исследованию полной системы, содержащей Р-компонент, OH-компонент и конденсирующий реагент, предшествовало детальное изучение реакции Р-компонента с конденсирующим реагентом в отсутствие OH-компонента. При действии ТПС на 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат в пиридине первоначально регистрируется та же последовательность превращения [27—29], что и в случаях ДЦК [58] (см. рис. 2).

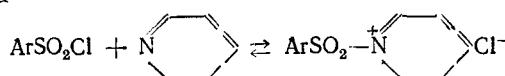
Для реакции $\text{pT}(\text{Ac})$ и образующегося из него пирофосфата $\text{O}[\text{pT}(\text{Ac})]_2$ показано, что порядок реакции по обоим компонентам близок к единице [39, 59], т. е. лимитирующей стадией процесса является взаимодействие конденсирующего реагента (по-видимому, в виде его пиридиневого производного) с одной молекулой фосфата или пирофосфата. Продуктом превращения пирофосфата является триполифосфат (XII). Это свидетельствует о превращении смешанного ангидрида пирофосфата и арилсульфокислоты в производное мононуклеотида, которое далее атакует непрореагировавший пирофосфат. После израсходования пирофосфата в реакционной смеси начинается накопление нуклеозид-5'-фосфорилпиридиния. Одновременно регистрируется накопление некоторого количества тетраполифосфата (XIII). В целом кинетика процесса удовлетворительно описывается следующей схемой:





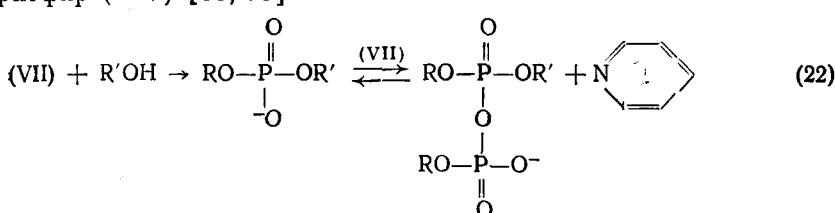
В таблице приведены величины констант скоростей для трех первых стадий взаимодействия рТ(Ас) и ТПС при 5° и величины энтропии и энталпии активации, оцененные для этих процессов [39].

При записи реакций (18) — (21) и при вычислении констант скоростей стадий (18) — (20) не учтено обнаруженное в работе [48] существенное ускоряющее действие пиридина на образование пиро- и полифосфатов. По-видимому, частицей, атакующей анионы фосфомоноэфира (X), пирофосфата (XI) и триполифосфата (XII), является арилсульфопиридиний-катион $\text{ArSO}_2\text{---N}^+ \begin{smallmatrix} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{smallmatrix}$. Константы скорости, приведенные в таблице, являются сложными и представляют собой значения истинных констант скорости элементарных реакций соединений (X) — (XII) с $\text{ArSO}_2\text{---N}^+ \begin{smallmatrix} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{smallmatrix}$, умноженные на постоянную концентрацию пиридина и на константу равновесия процесса



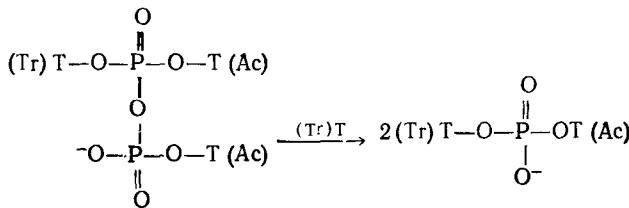
Пирофосфат (XI) лишь ненамного менее реакционноспособен по отношению к ТПС, чем исходный фосфомоноэфир [59]. Триполифосфат на порядок менее реакционноспособен [59], причем уменьшение константы скорости в основном связано с уменьшением энтропии активации.

В полной системе первоначально регистрируется та же последовательность превращений Р-компоненты. По мере появления в реакционной смеси соединения (VII) становится возможным образование новых межнуклеотидных связей. Однако, как уже указывалось, образующийся фосфодиэфир реагирует практически мгновенно с еще одной молекулой (VII), образуя пирофосфотриэфир (XIV) [55, 56].



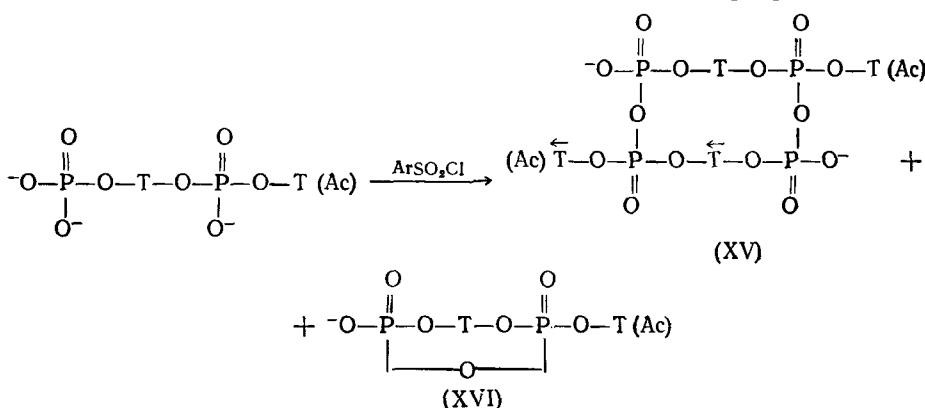
Пирофосфотриэфиры являются слабыми фосфорилирующими реагентами, константы скорости их взаимодействия со спиртами в пиридине примерно на два порядка ниже, чем для реакции (VII) с теми же спиртами.

Так, константа скорости реакции



в пиридине при 30° составляет $9 \cdot 10^{-5}$ л/моль·с, в то время как для реакции (17) при тех же условиях она равна $7,3 \cdot 10^{-3}$ л/моль·с [39].

Таким образом, даже в простейшем случае фосфодиэфирной конденсации при получении динуклеозидмоносфата одна из двух образующихся молекул активного фосфорилирующего производного (VII) переходит в существенно менее реакционноспособную форму. Ситуация еще более ухудшается, когда Р-компонент или OH-компонент (или оба) содержат фосфодиэфирные группы. Если OH-компонент является нуклеозидом, а олигонуклеотидом, то образующееся из Р-компонента соединение (VII) в первую очередь будет реагировать с фосфодиэфирными группами и лишь после того, как все они будут превращены в пирофосфотриэфирные, в заметной мере пойдет реакция с оксигруппами. Таким образом, нужен большой избыток соединения (VII), возрастающий по мере удлинения OH-компонента [38]. Если же олигонуклеотидом является Р-компонент, то при небольших избытках конденсирующего реагента вместо фосфорилпиридиниевых групп в нем самом будут образовываться пирофосфотриэфирные. Так, при действии небольших избытков ТПС на динуклеотид $\text{rTrT}(\text{Ac})$ регистрируется в основном образование соединений (XV) и (XVI) [56–62], обладающих низкой реакционной способностью (константы скорости реакции с (Tr)T при 30° в пиридине составляют $0,6 \cdot 10^{-4}$ и $2,8 \cdot 10^{-4}$ л/моль·с соответственно [39].

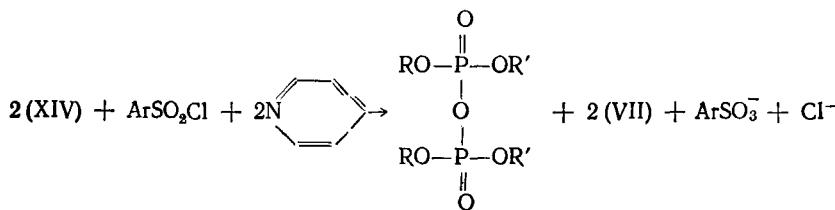


(Стрелка над Т обозначает направление от 5'- к 3'-ОН-группе тимидина).

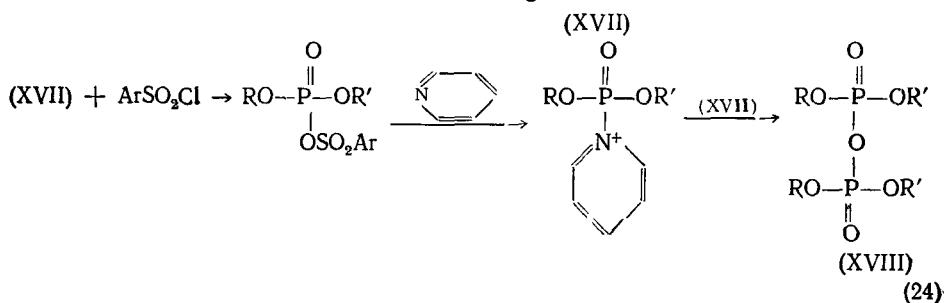
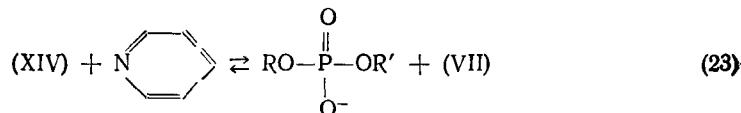
Соединения (XV) и (XVI), будучи получены в диметилформамиде в отсутствие пиридинина, настолько устойчивы к действию нуклеофилов, что могут быть хроматографически разделены в водном растворе [62]. Поэтому есть основания считать, что их реакция с OH-компонентом в пиридиновом растворе становится возможной в результате нуклеофильного катализа пиридином [63], т. е. в результате некоторой обратимости второй стадии процесса (22). То же справедливо и для соединения (XIV); как видно из величин констант скорости реакции этих пирофосфотриэфиров с (Tr)T, для этого достаточно присутствия в равновесии с (XIV) менее 2% соединения (VII), что находится за пределами чувствительности метода ЯМР ^{31}P .

Регенерация высокореакционноспособной фосфорилпиридиниевой формы из пирофосфотриэфира происходит также при действии избытка

конденсирующего реагента [55]. Процесс протекает по брутто-реакции.



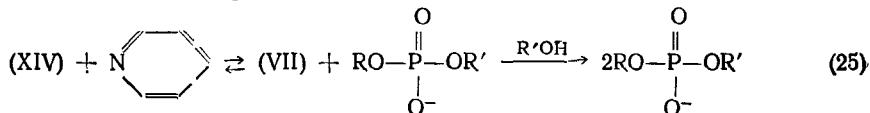
Механизм этого процесса можно представить себе следующим образом:



$\text{R}=(\text{Tr})\text{T}$, $\text{R}'=\text{T(Ac)}$

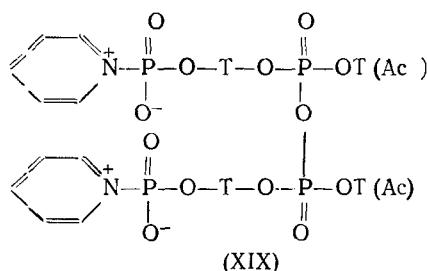
Следует отметить, что константа скорости реакции соединения (XVII) с ТПС — лимитирующей стадии процесса (24) — при 5° равна $3,1 \cdot 10^{-3}$ л/моль·с, т. е. всего в четыре раза меньше, чем для реакции с pT(Ac) [39].

При небольших избытках конденсирующего реагента, когда скорость процесса (24) невелика, преобладающим путем превращения (XIV) в диэфир может служить процесс (25):



Процессы (23), (24) приводят к превращению образовавшегося фосфодиэфира в пирофосфотетраэфир (XVIII), который может в известной мере реагировать с OH -компонентом, давая фосфотриэфир — побочный продукт в случае фосфодиэфирной конденсации.

Аналогичные превращения претерпевают, по-видимому, и пирофосфотриэфиры (XV) и (XVI). При достаточном избытке ТПС динуклеотид pTpT(Ac) превращается в соединение (XIX) [60–62]



содержащее высокореакционноспособные фосфорилпиридиновые группы (константа скорости реакции с $(\text{Tr})\text{T}$ при 30° равна $6,3 \cdot 10^{-3}$ л/моль·с [39]).

Реакция (VII) с оксигруппами вносит основной вклад в образование новых фосфодиэфирных групп [52]. На рис. 7 приведены кинетические

кривые накопления (VII) и (XIV) в реакции $pT(Ac)$ с $(Tr)T$ в присутствии ТПС при 2° . Одновременно, исходя из приведенной выше константы скорости реакции (17) — лимитирующей стадии образования (XIV), вычислена кинетическая кривая накопления (XIV) за счет этой реакции (пунктирная кривая на рис. 7). Видно, что расчетная и экспериментальная кривые хорошо совпадают. Следовательно, вклад реакции OH-компонента с другими реакционноспособными частицами в образование фосфодиэфира незначителен.

Таким образом, механизм фосфодиэфирных конденсаций даже в простейшем случае взаимодействия P-компонента, содержащего один фосфатный фрагмент, и OH-компонента, не содержащего фосфатных групп, до-

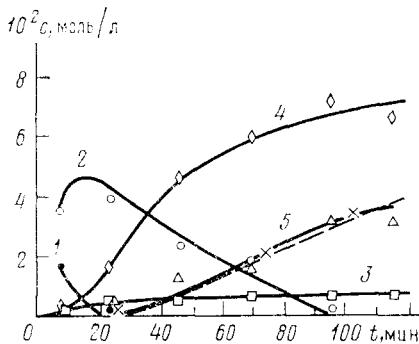


Рис. 7

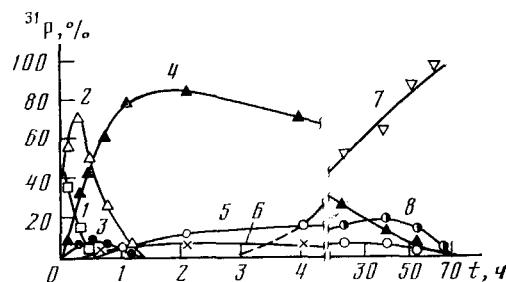
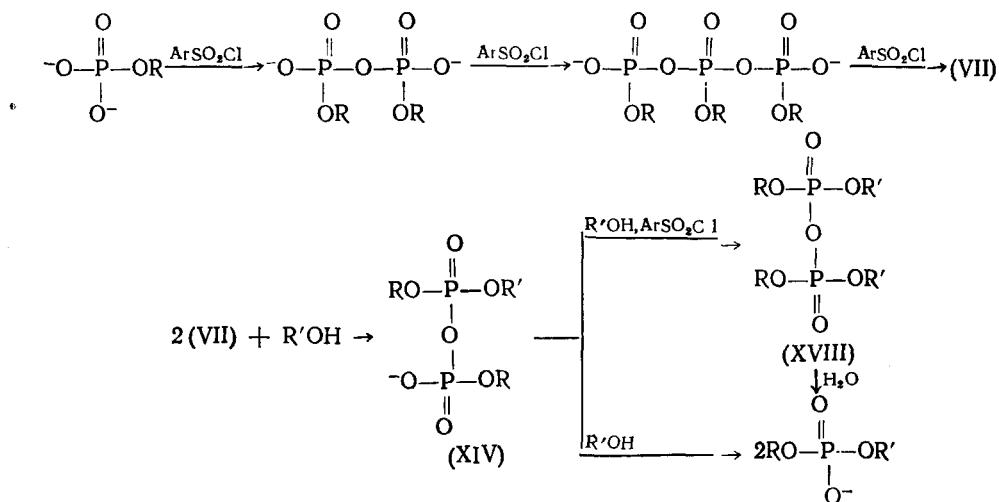


Рис. 8

Рис. 7. Кинетические кривые взаимодействия 0.15 M $pT(Ac)$ с 0.15 M $(Tr)T$ и 0.42 M ТПС в пиридине: 1 — $O[pT(Ac)]_2$, 2 — тринуклеозидтриполифосфат, 3 — тетрануклеозидтетраполифосфат, 4 — пиридиниевое производное $pT(Ac)$, 5 — пирофосфотриэфир (XIV) [51]

Рис. 8. Кинетические кривые взаимодействия 0.15 M $pT(Ac)$ с 0.3 M $(Tr)T$ и 1.5 M ДЦК при 22° в пиридине: 1 — пирофосфат $O[pT(Ac)]_2$, 2 — тринуклеозидтриполифосфат, 3 — тетрануклеозидтетраполифосфат, 4 — пирофосфотриэфир (XIV), 5 — $(Tr)TpT(Ac)$, 6 — интенсивность сигналов в области 5 м. д., 7 — уреидопроизводное динуклеозидфосфата, 8 — тетразамещенный пирофосфат (XVIII) [37]

статочно сложен и описывается системой превращений (18) — (25), большинство которых состоит из нескольких элементарных стадий. Основные этапы фосфодиэфирной конденсации в пиридине, регистрируемые методом ЯМР ^{31}P , представлены на схеме:



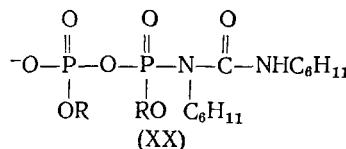
Фосфомоноэфир, независимо от присутствия OH-компонента, претерпевает последовательное превращение в замещенный пирофосфат, затем в соответствующий триполифосфат и пиридиниевое производное (VII). В присутствии OH-компонента производное (VII) реагирует с ним по ре-

акции (22), образуя тризамещенный пирофосфат (XIV); последний способен взаимодействовать с OH-компонентом, причем накапливается фосфодиэфир, однако примерно в 80 раз медленнее, чем (VII) [39].

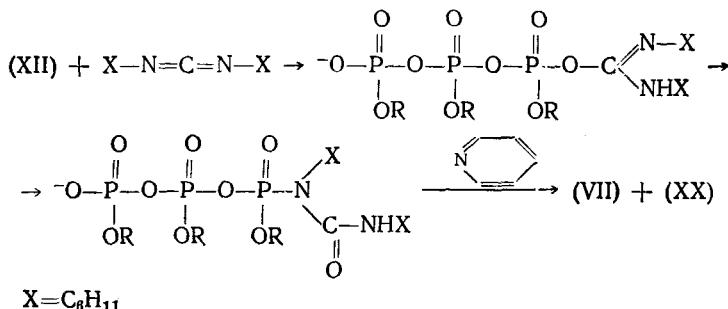
При достаточном избытке конденсирующего реагента в результате реакций (23), (24) будет накапливаться соединение (XVIII). Однако при разложении реакционной смеси водой оно легко гидролизуется до свободного фосфодиэфира [36, 58].

При взаимодействии рT(Ac) в пиридине со смесью трифенилфосфин-дипиридилсульфид наблюдается та же последовательность превращений Р-компонента в пирофосфат, триполифосфат и, наконец, в производное (XIV) [51]. В этом случае главным путем образования фосфодиэфирных групп также является реакция (22) [51].

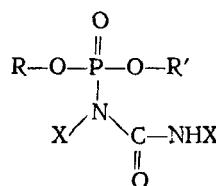
При взаимодействии рT(Ac) в пиридине с ДЦК процесс оказывается более сложным. Как в полной системе, так и в отсутствие OH-компонента, регистрируется та же последовательность превращения фосфомоноэфира в соответствующий пирофосфат и триполифосфат. Однако уже в отсутствие OH-компонента конечный состав реакционной смеси более сложный, чем в случае ТПС и смеси трифенилфосфин — дипиридилдисульфид. Наряду с (VII) сохраняется значительное количество триполифосфата (XII) и тетраполифосфата (XIII), а также регистрируются некоторые другие производные, среди которых значительная доля приходится на уреидопроизводное пирофосфата (XX) [58]:



Это производное, которое в свете механизма Корана [25] следует рассматривать как продукт изомеризации соответствующей O-фосфорилдиксилогексимочевины, начинает накапливаться уже после полного израсходования пирофосфата, т. е. скорее всего его образование связано с превращениями триполифосфата. Одним из возможных механизмов такого превращения является последовательность реакций:



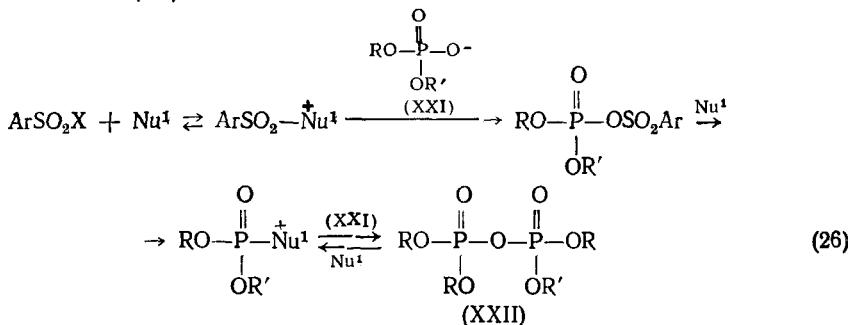
При проведении реакции в присутствии OH-компонента образование (VII) фактически не регистрируется (см. рис. 8), а образование (XX) заметно подавляется. В силу отсутствия (VII) в системе начинает накапливаться свободный фосфодиэфир, который лишь в незначительной мере превращается в пирофосфотетраэфир. В конечной реакционной смеси большая часть фосфодиэфира присутствует в виде уреидопроизводного:



Эти производные лишь медленно гидролизуются водой до соответствующего фосфодиэфира и диксилогексимочевины.

VI. МЕХАНИЗМ ФОСФОТРИЭФИРНЫХ КОНДЕНСАЦИЙ

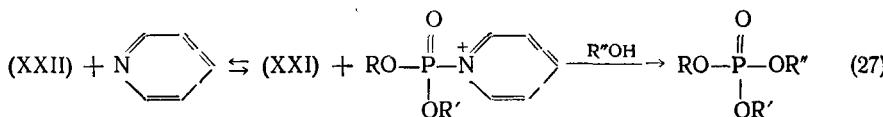
Первая фаза фосфотриэфирной конденсации описывается в зависимости от природы конденсирующего реагента уравнением (11) или (12) и далее уравнениями (15) и (16), т. е. в целом она может быть представлена уравнением (26):



R — остаток защищенного нуклеозида, R' — *n*-ClC₆H₄

Этот процесс аналогичен реакции (18) при фосфодиэфирной конденсации. Однако в отличие от нее пирофосфат (XXII) не претерпевает дальнейших превращений под действием конденсирующего реагента, т. е. процессы, аналогичные (19) — (21), при фосфотриэфирной конденсации отсутствуют.

Несспособность пирофосфата (XXII) к реакции с конденсирующим реагентом, исключающая реакцию, аналогичную (19), вместе с тем требует наличия какого-либо другого пути превращения пирофосфата в активное производное типа (II) или типа (III). Резонно предположить, что это происходит аналогично взаимодействию пирофосфотриэфира с OH-компонентом по реакции (27), аналогичной (25):



На рис. 9 представлены кинетические кривые накопления пирофосфотриэфира и фосфотриэфира и расходования исходного фосфодиэфира в реакции (Tr) Tp(C₆H₄Cl) с T(Ас) в пиридине в присутствии трехкратного избытка ТПС, полученные с помощью спектроскопии ЯМР ³¹P [42]. Видно, что если первая фаза реакции — накопление пирофосфата — заканчивается менее чем за час, то вторая фаза затягивается более чем на сутки. Столь продолжительный контакт OH-компонента с конденсирующим реагентом приводит к нежелательным побочным процессам, например, к сульфонилированию OH-компонента. Нет оснований сомневаться в чрезвычайно высокой электрофильности частицы (XXIII), несущей нескомпенсированный положительный заряд. По-видимому, малая скорость второй фазы реакции в пиридине связана с тем, что (XXIII), образуясь в виде ионной пары с анионом фосфодиэфира, преимущественно взаимодействует с последним, что очень сильно смещает равновесие первой реакции процесса (27) влево.

В соответствии со сказанным эффективными катализаторами второй фазы фосфотриэфирной конденсации оказались соединения двух типов. Во-первых, это соединения «пиридинового» типа — 4-N,N-диметиламино-пиридин [12, 13, 17] и N-метилимидазол [17, 18]. Являясь существенно более сильными нуклеофилами, чем пиридин, эти соединения, по-видимому, дают частицы типа (II), существенно более устойчивые, чем (XXIII). Во-вторых, такими катализаторами оказались тетразол [17, 41, 43] и 3-нитро-1,2,4-триазол [17], которые дают незаряженные производные фосфодиэфира типа (III). В качестве иллюстраций на рис. 10 приведены кинетические кривые для реакции (ClC₆H₄)_nT(Lev) с

$(NCC_2H_4)_2pT$ в пиридине в присутствии трехкратного избытка эквимолярной смеси ТПС и тетразола [17]. Реакция за час проходит более чем на 70%. Как и в случае реакции с ТПС в пиридине в отсутствие других катализитических добавок, на первой фазе реакции накапливается свыше 90% пироfosфата, который затем превращается в фосфотриэфир. В свете этих данных резкое ускорение фосфотриэфирной конденсации при замене арилсульфохлоридов арилсульфотетразолидами [4, 5] скорее всего объясняется тем, что на первой фазе реакции выделяется тетразол, катализирующий вторую фазу процесса. Сходные кинетические кривые с образованием до 90% пироfosфата на первой фазе получены и для всех остальных перечисленных катализаторов [17].

Чтобы установить роль пиридинина на стадии образования фосфотриэфира из пироfosфата, последний был получен в виде раствора в хлористом метилене из $(ClC_6H_4)pT(Ac)$ в присутствии ТПС и $(Tr)T$ в ка-

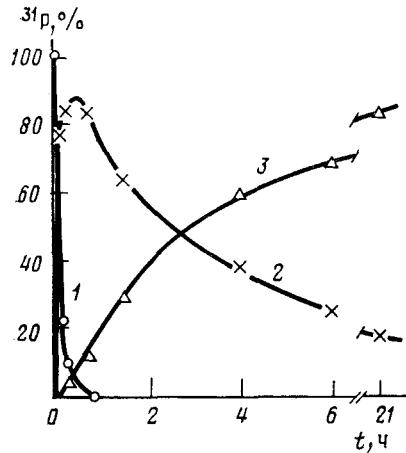


Рис. 9

Рис. 9. Кинетические кривые реакции $0.1\text{ M } (Tr)Tp(C_6H_4Cl)$ с $0.1\text{ M } T(Ac)$ и $0.3\text{ M } \text{ТПС}$ в пиридине при 30° : 1 — исходный диэфир, 2 — тетразамещенный пироfosфат (XXII),

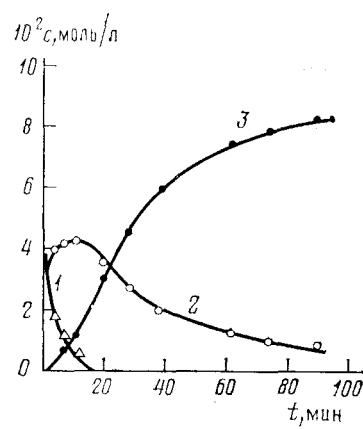
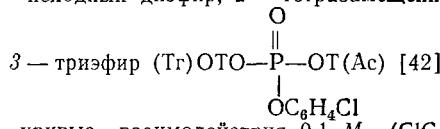
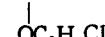


Рис. 10

Рис. 10. Кинетические кривые взаимодействия $0.1\text{ M } (ClC_6H_4)pT(Ac)$ с $0.1\text{ M } (NCC_2H_4)_2pT$, $0.3\text{ M } \text{ТПС}$ и $0.3\text{ M } \text{тетразола}$ при 20° в пиридине: 1 — $(ClC_6H_4)pT(\text{Lev})$,



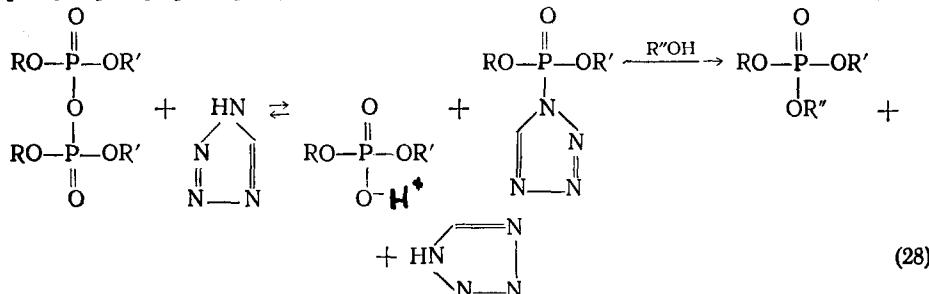
2 — пироfosфотетраэфир, 3 — фосфотриэфир $(NCC_2H_4)_2 pTO \text{—} \overset{\text{O}}{\underset{\text{OC}_6H_4\text{Cl}}{\underset{\parallel}{\text{P}}}} \text{—} \text{OT}$ [17]



честве OH -компонентента. В отсутствие пиридинина реакция на этом заканчивается; добавление пиридинина или γ -николина приводит к образованию динуклеозидфосфата. В то же время добавление бензо[b]-1,4-диазабицикло[2.2.2]октена, имеющего pK_a 5,6, близкое к pK_a пиридинина, не приводит к синтезу фосфотриэфира. Это свидетельствует о том, что на данной стадии пиридин играет в первую очередь роль нуклеофильного катализатора [43, 56].

Катализитическая роль тетразола была продемонстрирована на модельной реакции тетрафенилпироfosфата с $(Tr)T$ [41]. Чтобы исключить возможное влияние конденсирующего реагента, тетрафенилпироfosфат был получен взаимодействием дифенилфосфорной кислоты с дифенилхлорфосфатом. Небольшой избыток последнего обеспечивал отсутствие в системе нежелательных следов влаги. При добавлении $(Tr)T$ дифенилхлорфосфат в течение нескольких минут исчезает, и наблюдается постепенное превращение пироfosфата в дифенилфосфат и фосфотриэфир $(Tr)Tp(\text{OC}_6H_5)_2$ (рис. 11, а). Добавление тетразола одновременно с $(Tr)T$ приводит к многократному ускорению процесса (рис. 11, б); вместо нескольких часов реакция заканчивается менее чем за полчаса. Если одно-

временно с тетразолом добавляется триэтиламин, то реакция заканчивается быстрее, чем удается записать спектр ЯМР ^{31}P , т. е. менее чем за 1—2 мин. Сигнал дифенилfosфотетразолида ни в одном случае не регистрируется, что согласуется с отмеченным в гл. III быстрым взаимодействием этого соединения с OH-компонентом. В целом превращение пироfosфата в fosфотриэфир в присутствии тетразола можно представить схемой (28):



Равновесие первой стадии процесса (28) сильно смещено влево, поскольку добавление тетразола к раствору пирофосфата не приводит к появлению сигнала тетразолида фосфодиэфира в спектре ЯМР ^{31}P . Присутствие сильного основания должно смещать равновесие вправо (связывается протон), чем, возможно, объясняется резкое ускорение взаимодействия тетрафенилпирофосфата с $(\text{Tr})\text{T}$ в присутствии тетразола при

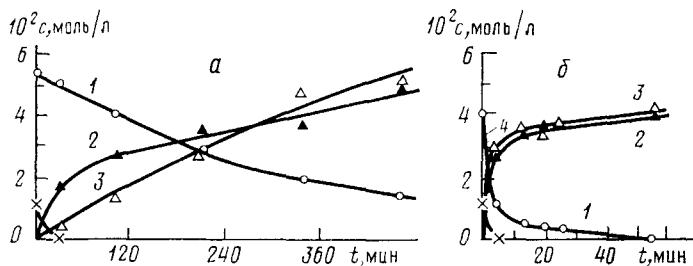
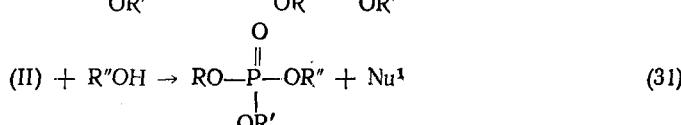
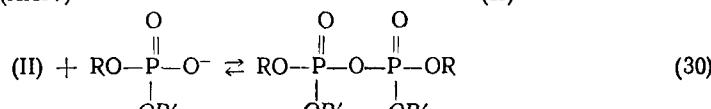
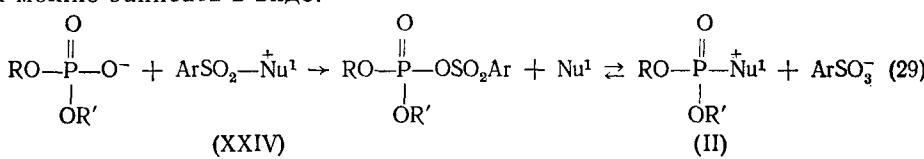


Рис. 11. Кинетические кривые реакций при 30° в пиридине: *a* — 0,05 M тетрафенилпирофосфата и 0,01 M дифенилхлорфосфата с 0,11 M (Tr)T; *b* — 0,04 M тетрафенилпирофосфата и 0,01 M дифенилхлорфосфата с 0,12 M (Tr)T в присутствии 0,25 M тетразола; *1* — тетрафенилпирофосфат, *2* — фосфотриэфир (Tr)TOP(O)(OPh)₂, *3* — дифенилфосфорная кислота. *4* — дифенилхлорфосфат [411]

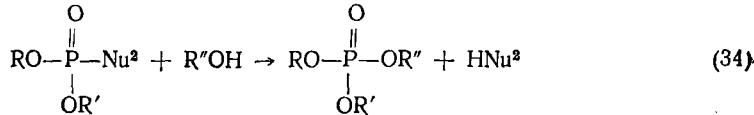
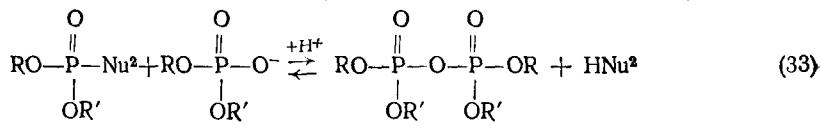
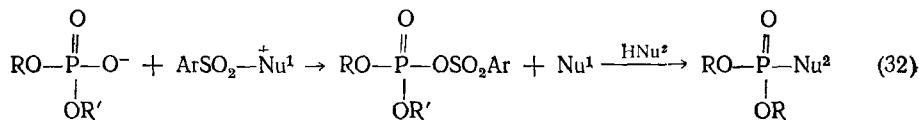
добавлении триэтиламина. Однако вклад в это ускорение процесса вносит и вторая стадия, которая, как описано в гл. III, также ускоряется триэтиламином.

С учетом изложенного выше, в том числе принимая во внимание, что с исходным фосфодиэфиром реагирует не сам конденсирующий реагент, а его производное $\text{ArSO}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{---}$, общую схему фосфотриэфирной конденсации в присутствии ТПС и пиридина или аналогичного ему катализатора можно записать в виде:



На первой фазе реакции частицы (II) преимущественно реагируют по пути (30), что приводит к накоплению пирофосфотетраэфира. По мере израсходования исходного фосфодиэфира процесс во все большей мере переключается на путь (31). Можно полагать, что во второй фазе реакции, когда в результате резкого уменьшения концентрации фосфодиэфира происходит обращение направления процесса (30), основная часть продукта образуется по реакциям (29) и (31).

Аналогичная схема может быть записана и для случая катализа тетразолом и нитрогриазолом:



Поскольку для протекания первой фазы реакции, в том числе для образования производного (XXIV), достаточно иметь катализаторы «пиридинового» типа, в фосфотриэфирных конденсациях пиридин может быть полностью заменен на N-метилимидазол, а в качестве растворителя могут быть использованы ацетонитрил, диоксан и ряд галогенуглеводородов [10, 15—18].

В отличие от этого тетразол не может переводить арилсульфохлорид в активное производное типа (XXIV). Для того чтобы произошла реакция арилсульфохлорида с тетразолом, приводящая к образованию арилсульфотетразолида, необходимо присутствие сильного основания; в пиридине такое взаимодействие в условиях фосфотриэфирной конденсации не происходит [6]. В то же время, как описано в гл. II, сильные амины препятствуют образованию смешанного ангидрида (VI) из арилсульфотетразолида и фосфодиэфира. Поэтому при катализе фосфотриэфирной конденсации тетразолом и нитрогриазолом в качестве растворителя* я должен использоваться пиридин, необходимый для образования (XXIV). Кроме того, пиридин участвует как основание в обратной реакции (33) и в реакции (34) [43].

Следует отметить, что хотя по характеру кинетических кривых (см. рис. 9, 20) пирофосфотетраэфир ведет себя как типичный промежуточный продукт, он, строго говоря, таковым не является. Реакции (30) и (33) являются не промежуточными, а обратимыми побочными реакциями. Их подавление может существенно ускорить процесс. Вопрос о том, возможно ли образование пирофосфотриэфира при проведении фосфотриэфирных конденсаций на нерастворимых полимерных носителях, когда Р-компонент закреплен на носителе, а OH-компонент находится в растворе [19, 64—67], остается открытым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Agarwal K. L., Büchi H., Caruthers M. N., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Raj-Bhandary U. L., van de Sander J. H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T. J. Mol. Biol., 1972, v. 209.
2. Khorana H., Agarwal K. L., Besmer P., Büchi H., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Jay E., Kleppe K., Kleppe R., Kumar A., Loewen P. C., Miller R. C., Minamoto K., Panet A., Raj-Bhandary U. L., Ramamoorthy B., Sekiva T., Takeya T., van der San der J. H. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 565.
3. Itakura K., Katagiri N., Narang S. A. Canad. J. Chem., 1974, v. 52, p. 3689.
4. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Ibid., 1976, v. 54, p. 670.
5. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 353.

6. *Seth A., Jay E. A.* Ibid., 1980, v. 8, p. 5445.
7. *Reese C. B., Titmas R. C., Yau L.* Tetrahedron Letters, 1978, v. 19, p. 2727.
8. *Reese C., Ubasawa A.* Ibid., 1980, v. 21, p. 2265.
9. *Charubala R., Pileiderer W.* Nucl. Acids Res., Symposium Series, 1981, p. 161.
10. *Каюшин Л. А., Берлин Ю. А., Колосов М. Н.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 660.
11. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Резвухин А. И., Ярмолинская Е. В.* Докл. АН СССР, 1979, т. 248, с. 1124.
12. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Форбрюгген Х.* Там же, 1980, т. 255, с. 1128.
13. *Knorre D. G., Zarytova V. F.* In: *Phosphorus Chemistry Directed towards Biology*. New York: Pergamon Press, 1980, p. 13.
14. *Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чахмакхчева О. Г.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 231.
15. *Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G.* Tetrahedron Letters, 1982, p. 961.
16. *Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G.* Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 5675.
17. *Ivanova E. M., Khalimskaya L. M., Romanenko V. P., Zarytova V. F.* Tetrahedron Letters, 1982, v. 23, p. 5447.
18. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* Докл. АН СССР, 1982, т. 265, с. 378.
19. *Горн В. В., Зарытова В. Ф.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, с. 1511.
20. *Эмануэль Н. М.* Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М.: Высшая школа, 1974.
21. *Микельсон А. М.* Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М.: Мир, 1962.
22. *Зарытова В. Ф., Райт Б. К., Черникова Т. С.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1626.
23. *Khorana H. G., Todd A. R.* J. Chem. Soc., 1953, p. 2257.
24. *Dekker C., Khorana H. G.* J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, p. 3522.
25. *Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G.* Ibid., 1958, v. 80, p. 6204.
26. *Weitmann G., Khorana H. G.* Ibid., 1962, v. 84, p. 6223.
27. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И.* Докл. АН СССР, 1973, т. 212, с. 630.
28. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Резвухин А. И.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1974, вып. 1, № 2, с. 85.
29. *Knorre D. G., Lebedev A. V., Levin A. S., Rezvukhin A. I., Zarytova V. F.* Tetrahedron, 1974, p. 3073.
30. *Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г., Олейнич Л. Г.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1972, вып. 1, № 2, с. 120.
31. *Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Мушина Г. С., Сайкович Е. Г.* Там же, 1967, вып. 3, № 7, с. 137.
32. *Браславский Б. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Коробейничева И. К., Курбатов В. А.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 759.
33. *Mikaiyama T., Hashimoto M.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1971, v. 44, p. 196.
34. *Mikaiyama T.* Phosphorus and Sulfur, 1976, v. 1, p. 371.
35. *Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н.* Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 613.
36. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1974, вып. 3, № 7, с. 126.
37. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В.* Биоорган. химия, 1976, т. 2, с. 189.
38. *Knorre D. G., Zarytova V. F.* Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, p. 2709.
39. *Knorre D. G., Zarytova V. F., Lebedev A. V., Khalimskaya L. M., Sheshegova E. A.* Ibid., 1978, v. 5, p. 1253.
40. *Зарытова В. Ф., Шешегова Е. А.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, с. 901.
41. *Зарытова В. Ф., Халимская Л. М., Ярмолинская Е. В.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1980, вып. 6, № 14, с. 78.
42. *Дроздова Л. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Там же, 1981, вып. 1, № 2, с. 125.
43. *Зарытова В. Ф., Шишкин Г. В., Халимская Л. М.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, с. 900.
44. *Corby N. S., Kenner G. W., Todd A. R.* J. Chem. Soc., 1952, p. 1124.
45. *Todd A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1959, v. 45, p. 1389.
46. *Jacob T. M., Khorana H. G.* J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, p. 1630.
47. *Мальцева Т. В., Иванова Е. М., Коробейничева И. К., Зарытова В. Ф.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1982, вып. 3, № 7, с. 120.
48. *Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Там же, 1982, вып. 6, № 14, с. 119.
49. *Туркин С. И., Потапов В. К., Шабарова З. А., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* Биоорган. химия, 1975, т. 1, с. 1430.
50. *Лебедев А. В., Резвухин А. И.* Там же, 1983, т. 9, с. 149.
51. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Старостин В. П., Халимская Л. М.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1979, вып. 1, № 2, с. 88.
52. *Zarytova V. F., Graifer D. M., Ivanova E. M., Knorre D. G., Lebedev A. V., Rezvukhin A. I.* Nucl. Acids Res. Spec. Publ., 1978, № 4, p. 209.
53. *Грайфер Д. М., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Резвухин А. И.* Докл. АН СССР, 1978, т. 242, с. 616.
54. *Weitmann G., Khorana H. G.* Chem. and Ind., 1962, p. 271.
55. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И.* Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1974, вып. 3, № 7, с. 121.
56. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И.* Там же, 1974, вып. 2, № 4, с. 139.

57. Zarytova V. F., Knorre D. G. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, p. 2091.
58. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1976, т. 2, с. 189.
59. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Халимская Л. М. Ж. физ. химии, 1975, т. 49, с. 2504.
60. Бадашкевич А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. Докл. АН СССР, 1975, т. 222, с. 97.
61. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, p. 1401.
62. Зарытова В. Ф., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1211.
63. Lebedev A. V., Zarytova V. F. XI Int. Symp. on Chemistry of Natural Products. Varna: 1978, p. 283.
64. Потапов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова З. А., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, с. 1386.
65. Амирханов Н. В., Кумарев В. П., Ривкин М. И., Рыбаков В. И. Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 126.
66. Синяков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Там же, 1982, т. 8, с. 490.
67. Belagaje R., Brush C. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 6295.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения АН СССР