



УДК 577.113.6.088.53 : 543.422.25

© 1993 г. Е. В. Вязовкина, И. В. Энгельс\*, А. В. Лебедев

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВVIII\* ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНЫХ КОНФИГУРАЦИЙ  
ПРИ АТОМЕ ФОСФОРА ДИАСТЕРЕОМЕРОВ  
ДЕЗОКСИДИНУКЛЕОЗИДМЕТИЛФОСФОНАТОВ  
МЕТОДОМ ДВУМЕРНОЙ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ROESY

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН;  
\* Институт органической химии Университета им. Гете, Франкфурт-на-Майне

Методом двумерной ЯМР-спектроскопии исследованы 16 пар индивидуальных диастереомеров дезоксидинуклеозидметилфосфонатов общей структуры  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Np}(\text{CH}_2)\text{N}(\text{Ac})$ , где N и N' — защищенные по экзациклическим аминогруппам гетероциклов остатки нуклеозидов. Проведено отнесение сигналов протонов гетероциклических оснований, дезоксирибозы, метилфосфонатного фрагмента, защитных групп. В спектрах ROESY обнаружены кросс-пики взаимодействия метилфосфонатного фрагмента с протонами дезоксирибозы и гетероциклических оснований. Найдены закономерности, связывающие интенсивности ряда характерных ROESY-сигналов с конфигурацией при асимметрическом атоме фосфора метилфосфонатной группы диастереомеров. Полученные результаты в совокупности с литературными данными позволили определить абсолютные конфигурации всех 32 диастереомеров.

Олигодезоксинуклеозидметилфосфонаты, аналоги олигодезоксинуклеотидов, содержащие неприродную межнуклеозидную связь  $-\text{O}-\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})-\text{O}-$ , являются перспективными заменителями природных олигонуклеотидов при использовании их в качестве антисмысловых олигонуклеотидов [2, 3]. Однако основная проблема, сдерживающая их широкое применение, — особенность их структуры, заключающаяся в том, что наличие четырех различных заместителей при каждом межнуклеозидном атоме фосфора обуславливает существование таких производных в виде  $2^n$ -диастереомеров для олигонуклеотида, содержащего n асимметрических атомов фосфора. Диастереомерный характер таких молекул обуславливает различие их физико-химических свойств, таких, как растворимость, параметры спектра кругового дихроизма, хроматографические характеристики [4–6]. Резко различаются и биологические свойства диастереомеров [7, 8]. Поэтому для правильной интерпретации результатов физико-химических и биологических экспериментов необходимо использовать олигомеры с заранее известной конфигурацией. Пока не разработан стереоселективный метод синтеза гетерогенных олигодезоксинуклеозидметилфосфонатов, разделение диастереомеров методом хроматографии на силикагеле [4], обращенно-фазовой [5] или аффинной хро-

\* Сообщение VII см. [1]. Для краткости префикс «d» в обозначении дезоксинуклеотидов опущен, защитные группы в большинстве случаев не приведены, поэтому следует учитывать, что обозначения GA, CA и т. п. соответствуют не свободным, а защищенным динуклеозидметилфосфонатам (если не указаны специально). Использовались 4,4'-диметокситритильная для защиты 5'-гидроксила, ацетильная — для 3'-гидроксила, изобутирильная (ib) — для 2-NH<sub>2</sub>-группы гуанина и бензоильные группы для защиты экзациклических аминогрупп аденина и цитозина (исключения — см. в подписи к табл. 2).

Литературные данные по установлению абсолютных конфигураций при атоме фосфора свободных диастереомеров дезоксидинуклеозидметилфосфонатов (во всех случаях — для изомера с меньшим временем удержания из каждой пары диастереомеров при обращенно-фазовой ВЭЖХ)

Диастереомер состава	Конфигурация по данным метода			
	ЯМР (NOE)	ЯМР (ROE)	Рентгеноструктурный анализ	Стереоселективная реакция
AA		$R_p$ [9]		$R_p$ [5]
CC				$R_p$ [5]
ТГ		$R_p$ [10]	$R_p$ [9]	$R_p$ [5]
GG				$R_p$ [5]
AT	$R_p$ [11]	$R_p$ [10]	$R_p$ [12]	
TA		$R_p$ [10]		
CG		$R_p$ [10]	$R_p$ [13]	
GA	$R_p$ [11]			
TC	$R_p$ [11]			

матогрaфии [6] — наиболее приемлемый метод получения индивидуальных диастереомеров, но в таком случае необходимо определение абсолютной конфигурации при атоме фосфора в полученных олигонуклеозидметилфосфонатах. Первым шагом в этом направлении должно быть определение абсолютных конфигураций для всех 16 пар диастереомеров дезоксидинуклеозидметилфосфонатов. К настоящему времени проведено отнесение абсолютных конфигураций лишь для некоторых диастереомеров (табл. 1).

Наиболее многообещающим оказался подход, предложенный Лёшнером и Энгельсом в работе [10], в которой конфигурации определяли методом двумерной ЯМР-спектроскопии ROESY. На примере нескольких пар диастереомеров было показано совпадение полученных отнесений с отнесениями, проведенными другими методами. В своей основе метод ROESY базируется на тех же принципах, что и метод NOESY (см., например, обзор [14]). Наиболее существенное различие между ними заключается в том, что для молекул с молекулярной массой 1000 (именно такая молекулярная масса у динуклеозидметилфосфонатов) при использовании метода NOESY эффекты практически не детектируются в связи с тем, что соответствующая скорость кросс-релаксации протонов близка к нулю из-за получающегося соотношения времени корреляции молекулы и рабочей частоты спектрометра. В случае применения методики ROESY во всем диапазоне молекулярных масс (и соответствующих времен корреляции) скорость кросс-релаксации всегда положительна и интенсивность ROE-сигналов может достигать 20—34% от интенсивности диагонального сигнала.

В настоящей работе приведены результаты исследований всех 32 диастереомерных защищенных дезоксидинуклеозидметилфосфонатов методом ROESY. Публикуемые данные позволяют сделать однозначные выводы об абсолютной конфигурации при асимметрическом атоме фосфора для всех диастереомеров.

На первом этапе работы было проведено отнесение всех сигналов протонов гетероциклических оснований, сахаров и защитных групп и соответствующих кросс-пиков в спектрах ROESY для всех дезоксидинуклеозидметилфосфонатов. В отдельных случаях не удалось провести полного отнесения сигналов в ароматической области спектра из-за перекрывания сигналов диметокситритильной и бензоильной защитных групп. Были определены значения химических сдвигов сигналов протонов P—CH<sub>3</sub>-группы для пар диастереомеров (табл. 2). В большинстве случаев химический сдвиг сигнала протонов P—CH<sub>3</sub> первого диастере-

Кросс-взаимодействие в спектрах ROESY и химические сдвиги сигналов протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы. Исползованные защитные группы (исключения см. в примечаниях) и нумерацию диастереомеров динуклеозидметилфосфонатов (здесь и во всех случаях порядок совпадает с R<sub>p</sub>- и S<sub>p</sub>-конфигурациями при атоме фосфора) см. в тексте статьи, Н5' и Н5'' — протоны, имеющие более высоко- и низкопольные химические сдвиги соответственно. Плюс означает наличие кросс-взаимодействия (число плюсов характеризует интенсивность сигнала), минус — отсутствие взаимодействия; данные для перекрывающихся сигналов приведены в скобках

Защищенный диастереомер метилфосфоната состава	Кросс-взаимодействия с протоном								δ <sub>СН<sub>3</sub></sub> , м.д.
	5'-фрагмент				3'-фрагмент				
	НЗ'	Н4'	Н5'	Н5''	НЗ'	Н4'	Н5'	Н5''	
GG1	+++	++	+	+	-	(-)	++	++	1,45
GG2	+++	(-)	-	-	(+)	+	++	++	1,45
GA1 *	++	+++	+	+	-	(+)	+	+	1,45
GA2 *	+++	++	+	+	+	++	+	+	1,45
GT1	++	++	-	-	-	(++)	++	++	1,47
GT2	++	-	-	-	++	++	++	++	1,55
GC1	+++	+++	+	+	-	+	++	++	1,54
GC2	+++	++	-	-	++	++	++	++	1,58
AG1	++	++	-	-	+	(++)	++	++	1,55
AG2	+++	(-)	-	-	(+)	++	++	++	1,50
AA1 **	+++	++	-	-	-	+	++	++	1,63
AA2	+++	-	-	-	(-)	+	++	++	1,63
AT1	+++	++	-	-	-	+	++	++	1,48
AT2	+++	+	-	-	+	++	++	++	1,51
AC1	+++	(++)	+	+	+	(+)	+	+	1,50
AC2	+++	-	-	-	-	(+++)	+	+	1,51
TG1 *	++	+++	+	+	++	++	++	++	1,53
TG2 *	++	+	-	-	+	+	++	++	1,50
TA1 ***	+++	++	+	+	(-)	(+)	+	+	1,33
TA2 ***	+++	+	-	-	+	(+)	+	+	1,38
TT1 ***	+++	(+)	+	+	-	(+)	++	++	1,46
TT2 ***	+++	+	-	-	++	+++	++	++	1,50
TC1 ***	+++	+++	-	-	-	(-)	++	++	1,42
TC2 ***	+++	(-)	-	-	(+)	+++	++	++	1,48
CG1	+++	+	+	+	+	++	+	+	1,47
CG2	+++	(+)	-	-	-	+	++	++	1,47
CA1	+++	+++	++	++	+	+	++	++	1,35
CA2	+++	+	+	+	+	++	++	++	1,47
C11	++	+	+	+	-	(+)	++	++	1,45
CT2	+++	+	-	-	+++	++	++	++	1,55
CC1	++	(+)	+	+	-	(+)	+	+	1,45
CC2	+++	+	-	-	++	++	+	+	1,52

\* Не содержится 5'-защитной группы.

\*\* Приведены результаты работы [10], где данные по протонам Н(5', 5'') отсутствуют.

\*\*\* Использована 5'-O-MeOTf-защитная группа.

омера по сравнению со вторым находится в более сильном поле \*. Однако для пар диастереомеров состава GG, GA, CG и AA химические сдвиги метилфосфонатных протонов совпадают, а для пар состава AG и TG реализуется обратный порядок.

Полные ROESY-спектры пары диастереомеров метилфосфоната [(MeO)<sub>2</sub>Tr] × Tr(CH<sub>3</sub>)bzA(Ac) (TA1 и TA2) с отнесением сигналов протонов, представленные в качестве примера (рис. 1), демонстрируют наличие большого количества кросс-пиков, соответствующих взаимодействиям протонов дезоксирибозы с протонами

\* Нумерация диастереомеров — в порядке выхода с колонки при хроматографии на силикагеле.

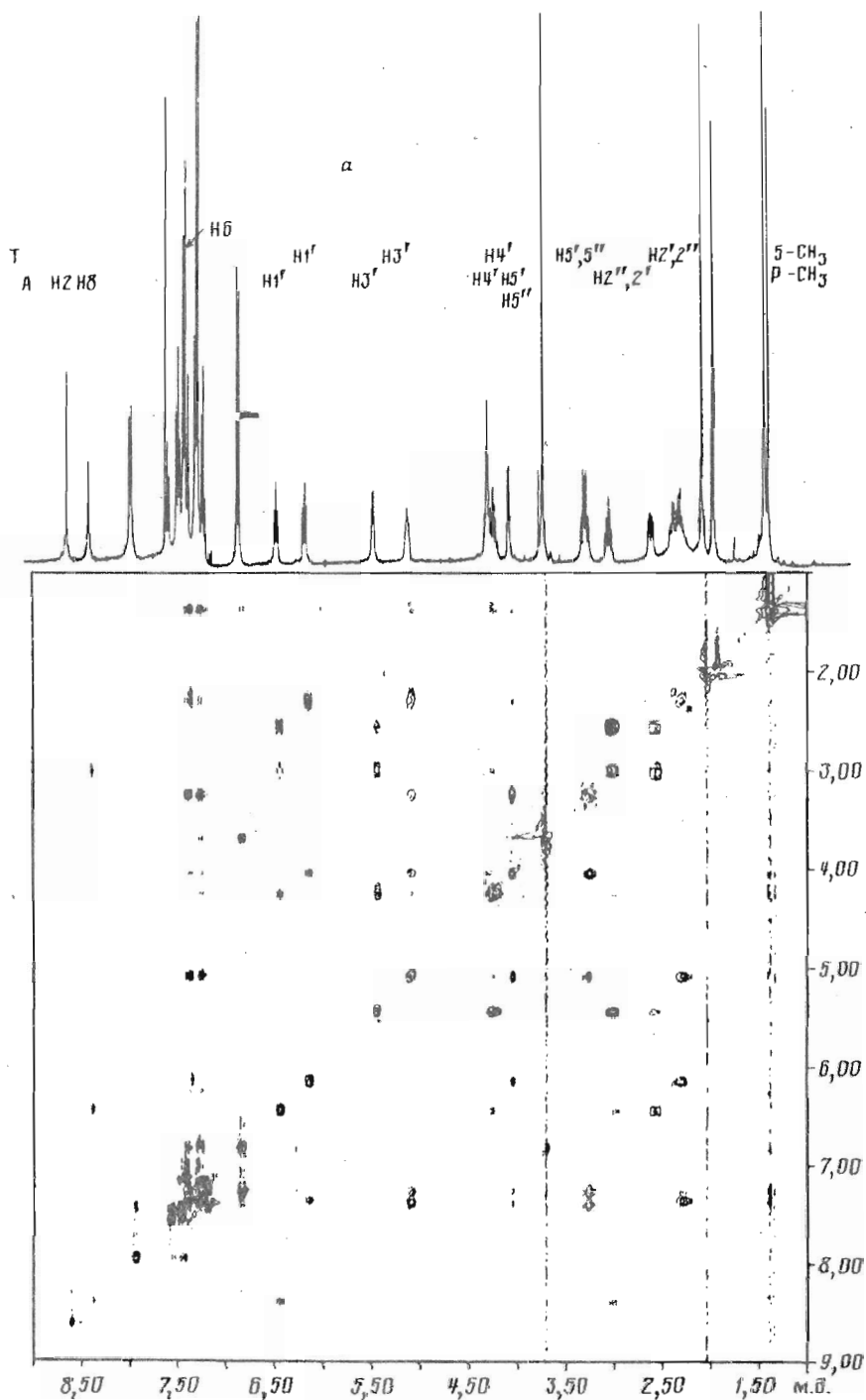


Рис. 1. Двумерные спектры ROESY первого ( $R_p$ ) (а) и второго ( $S_p$ ) (б) диастереомеров  $[(MeO)_2Tr]Tr(CH_3)bzA(Ac)$

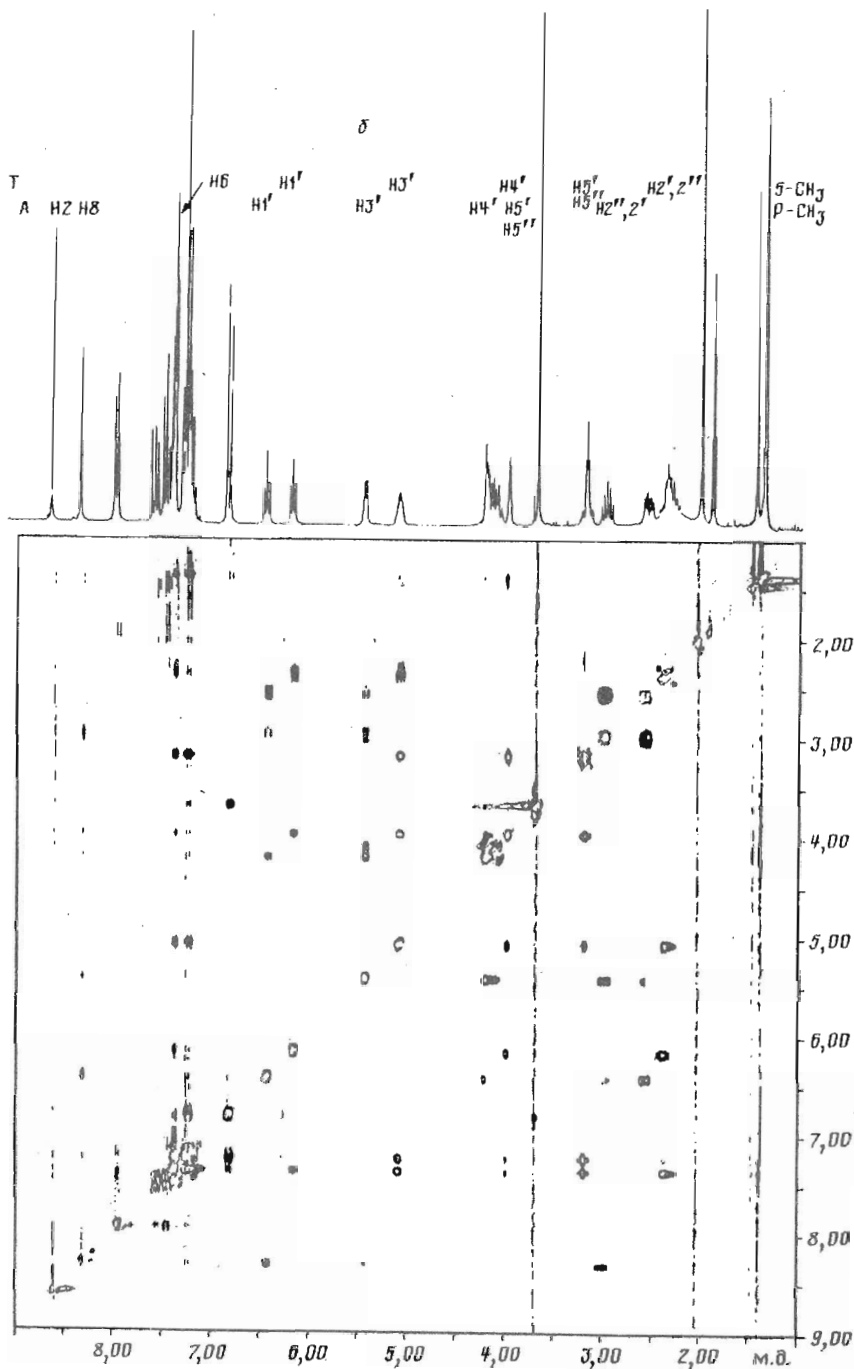


Рис. 1 б

гетероциклического основания, протонов диметокситритильной группы с протонами 5'-концевого нуклеозидного остатка, межпротонным взаимодействиям в дезоксирибозе. Однако анализ показывает, что в спектрах отсутствуют кросс-пики, указывающие на взаимодействия между 5'- и 3'-концевыми нуклеозидными

фрагментами. Протоны Р—СН<sub>3</sub>-группы взаимодействуют с протонами обоих нуклеозидов и диметокситритильной группы. Аналогичные результаты были получены для всех исследованных димеров (спектры не приводятся).

Был проведен полуколичественный анализ взаимодействий протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы для всех димеров. Результаты представлены в табл. 2 с указанием относительных интенсивностей кросс-пиков. Из-за частичного перекрывания сигналов протонов Н(4') и Н(5', 5'') дезоксирибозы и метильных сигналов Р—СН<sub>3</sub>- и тимидиновых 5-СН<sub>3</sub>-групп в ряде случаев оказалось возможным провести только приблизительную оценку относительных интенсивностей сигналов (приведены в скобках).

Известно, что интенсивность кросс-пиков в спектрах ROESY (*I*) связана с расстоянием между взаимодействующими протонами соотношением  $I \sim r^{-6}$  [14]. Таким образом, возможно оценить расстояния между Р—СН<sub>3</sub>-группой и ближайшими протонами дезоксирибозы 5'- и 3'-концевых нуклеозидных остатков. Резонно ожидать при этом наличия каких-либо достаточно общих корреляций между интенсивностью сигналов соответствующих кросс-пиков и абсолютной конфигурацией метилфосфонатного фрагмента. На этом основании можно сделать надежные выводы о принадлежности того или иного диастереомера к семейству динуклеозидметилфосфонатов с данной или противоположной конфигурацией при атоме фосфора. Как видно из табл. 2, все же не существует универсального правила для отнесения конфигураций у всех 16 пар диастереомеров. Однако при анализе взаимодействий протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы четко прослеживаются три типа взаимодействий:

- взаимодействие с протоном Н(4') 5'-концевого нуклеозидного остатка;
- взаимодействие с протонами Н(5', 5'') 5'-концевого нуклеозидного остатка;
- взаимодействие с протонами Н(3') и Н(4') 3'-концевого нуклеозидного остатка.

Первый тип взаимодействий, обнаруженный ранее Лёцнером и Энгельсом [10], применим к защищенным димерам, содержащим 5'-концевые нуклеозидные остатки А, G, T. В этом случае протоны Р—СН<sub>3</sub>-группы и протоны Н(4') 5'-концевого нуклеозидного остатка связаны между собой интенсивным кросс-релаксационным взаимодействием в случае первого изомера, тогда как соответствующий кросс-пик в спектре ROESY для второго изомера отсутствует или имеет низкую интенсивность.

Второй тип взаимодействий реализуется для димеров, содержащих нуклеозидные остатки 5'-С и 5'-Т (исключение составляет TC). Он характеризуется наличием интенсивного кросс-пика между сигналами протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы и Н(5', 5'')-протонами 5'-пиримидинового нуклеозида в случае первого изомера, тогда как соответствующий кросс-пик для второго изомера отсутствует или значительно слабее.

Третий тип взаимодействий характерен для димеров, содержащих 3'-пиримидиновые остатки. В этом случае наблюдаются интенсивные кросс-пики между протонами Р—СН<sub>3</sub>-группы и Н(3')-, Н(4')-протонами 3'-пиримидинового остатка во втором изомере. Соответствующие кросс-пики в первом изомере отсутствуют или значительно слабее по интенсивности.

Совокупность вышеизложенных правил представлена в табл. 3.

Для взаимодействий протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протонами гетероциклических оснований не было обнаружено каких-либо общих закономерностей. Тем не менее можно отметить взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протоном Н(8) 5'-G во втором изомере для всех димеров, содержащих остаток дезоксигуанозина в 5'-концевом фрагменте.

В качестве примера на рис. 2 приведены фрагменты спектров ROESY для дезоксидинуклеозидметилфосфонатов состава [(MeO)<sub>2</sub>Tg]bzCp(CH<sub>3</sub>)T(Ac) (CT1 и CT2). На рис. 2а виден отчетливый кросс-пик, соответствующий взаимодействию протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с Н(5', 5'')-протонами нуклеозидного остатка 5'-С в случае первого изомера. Соответствующий кросс-пик для второго изомера от-

Основные закономерности, характерные для кросс-релаксационных взаимодействий протонов динуклеозидметилфосфонатов различного состава  
 \*+\* означает наличие взаимодействия с соответствующим протоном указанного диастереомера, тогда как для другого диастереомера взаимодействие отсутствует или значительно слабее

Диастереомер состава	Кросс-взаимодействия с протонами Р—СН <sub>3</sub> -группы		
	диастереомер 1		диастереомер 2
	Н4' 5'-фрагмента	Н5', Н5'' 5'-фрагмента	Н3', Н4' 3'-фрагмента
GG	+		
GA	+		
GT	+		+
GC	+		+
AG	+		
AA	+		
AT	+		+
AC	+		+
TG	+	+	
TA	+	+	
TT	+	+	+
TC	+		+
CG		+	
CA	+	+	
CT		+	+
CC		+	+
	(правило 1)	(правило 2)	(правило 3)

сутствует (см. рис. 2б) (правило 2). Для этой же пары диастереомеров применимо и правило 3: наличие взаимодействия протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протонами Н(3') и Н(4') 3'-пиримидинового нуклеозидного остатка (3'-Т) для второго изомера. Для первого изомера соответствующее взаимодействие с протоном Н(3') отсутствует, а с протоном Н(4') — значительно слабее. На рис. 3 показаны фрагменты спектров ROESY диастереомеров GC1 и GC2 димера [(MeO)<sub>2</sub>Tr]ibGp(CH<sub>3</sub>)bzC(AC). Интенсивный кросс-пик, соответствующий взаимодействию протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протоном Н(4') нуклеозидного остатка 5'-G, наблюдается в случае первого изомера, тогда как для второго изомера соответствующий сигнал значительно слабее.

В работе [11] с помощью методики NOESY было показано, что в самокомплементарном дуплексе, содержащем одну метилфосфонатную связь в олигонуклеотидной цепи, взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протонами дезоксирибозы различно для различных диастереомеров. S<sub>p</sub>-Конфигурация была приписана изомеру, для которого наблюдался кросс-пик между сигналами протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы и протоном Н(3') 5'-нуклеозидного остатка, тогда как R<sub>p</sub>-конфигурация была приписана изомеру, не имеющему подобного взаимодействия. Вообще говоря, в случае димера в органическом растворителе нельзя ожидать для него конформации, подобной той, которая существует для метилфосфонатного фрагмента в составе олигонуклеотидного дуплекса в водном растворе. Результаты компьютерного стереохимического моделирования, выполненные для R- и S-диастереомеров метилфосфонатных фрагментов в составе комплементарного комплекса [15], а также для свободных нуклеозид-3'-метилфосфонатов [16], показывают возможность существования конформеров, в которых может присутствовать взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протоном Н(3') 5'-нуклеозидного остатка для обоих диастереомеров. Таким образом, наличие (или отсутствие) взаимодействия между этими протонами не может служить критерием для установления абсолютной конфигурации диастереомера. Основываясь на знании

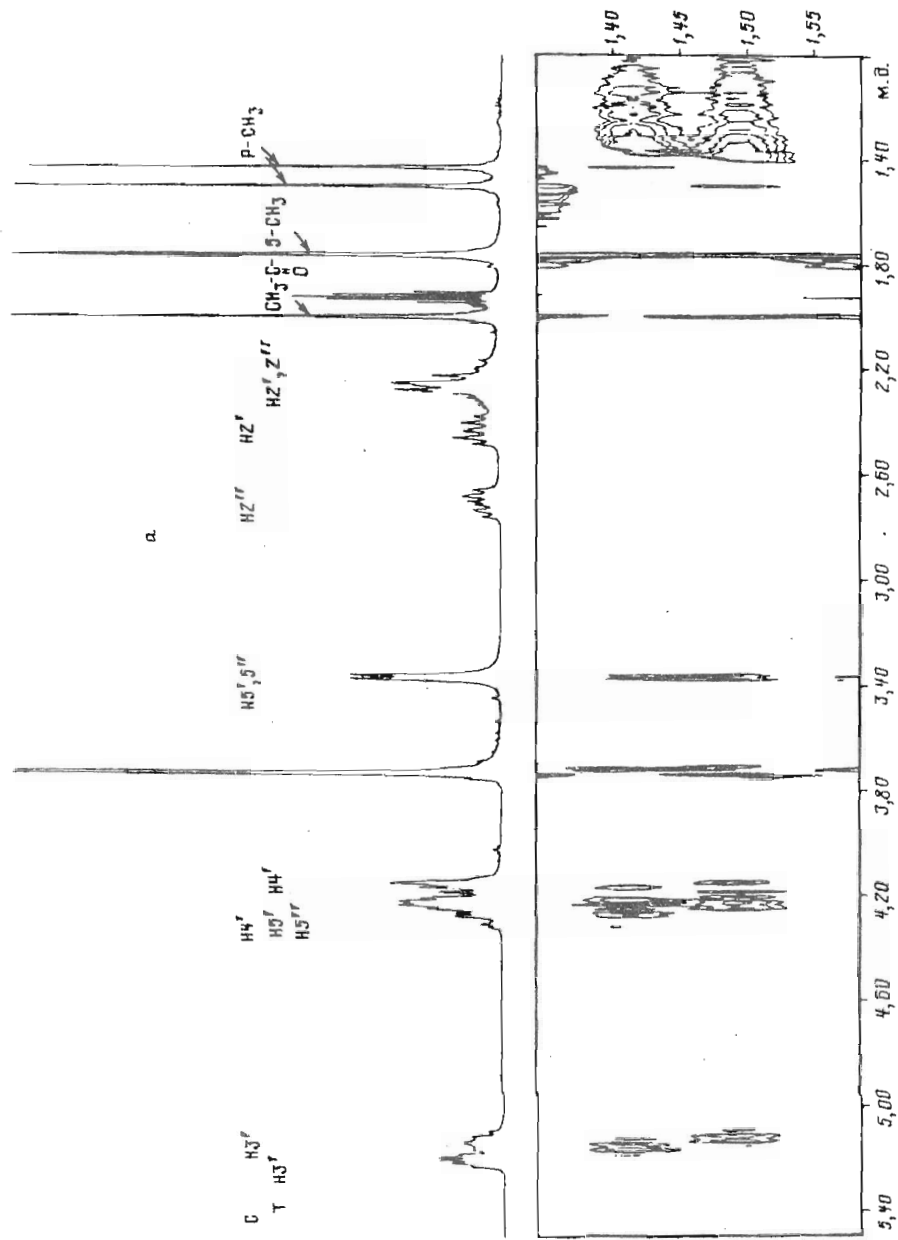


Рис. 2. Фрагменты двумерных спектров ROESY диастереомеров первого ( $R_p$ ) (a) и второго ( $S_p$ ) (б) диастереомеров  $[(\text{MeO})_2\text{T}]\text{bzCr}(\text{CH}_3)\text{T}(\text{Ac})$



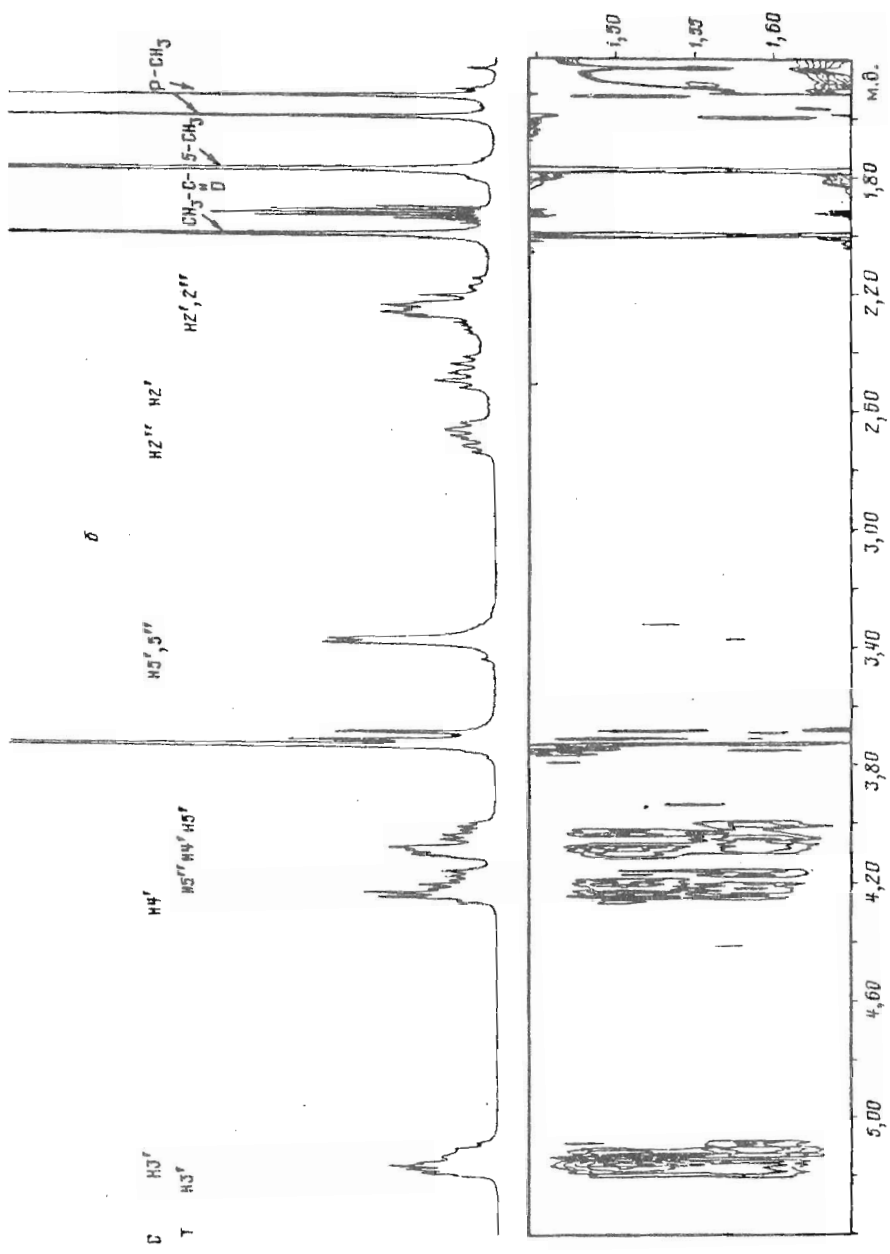


Рис. 2, 6

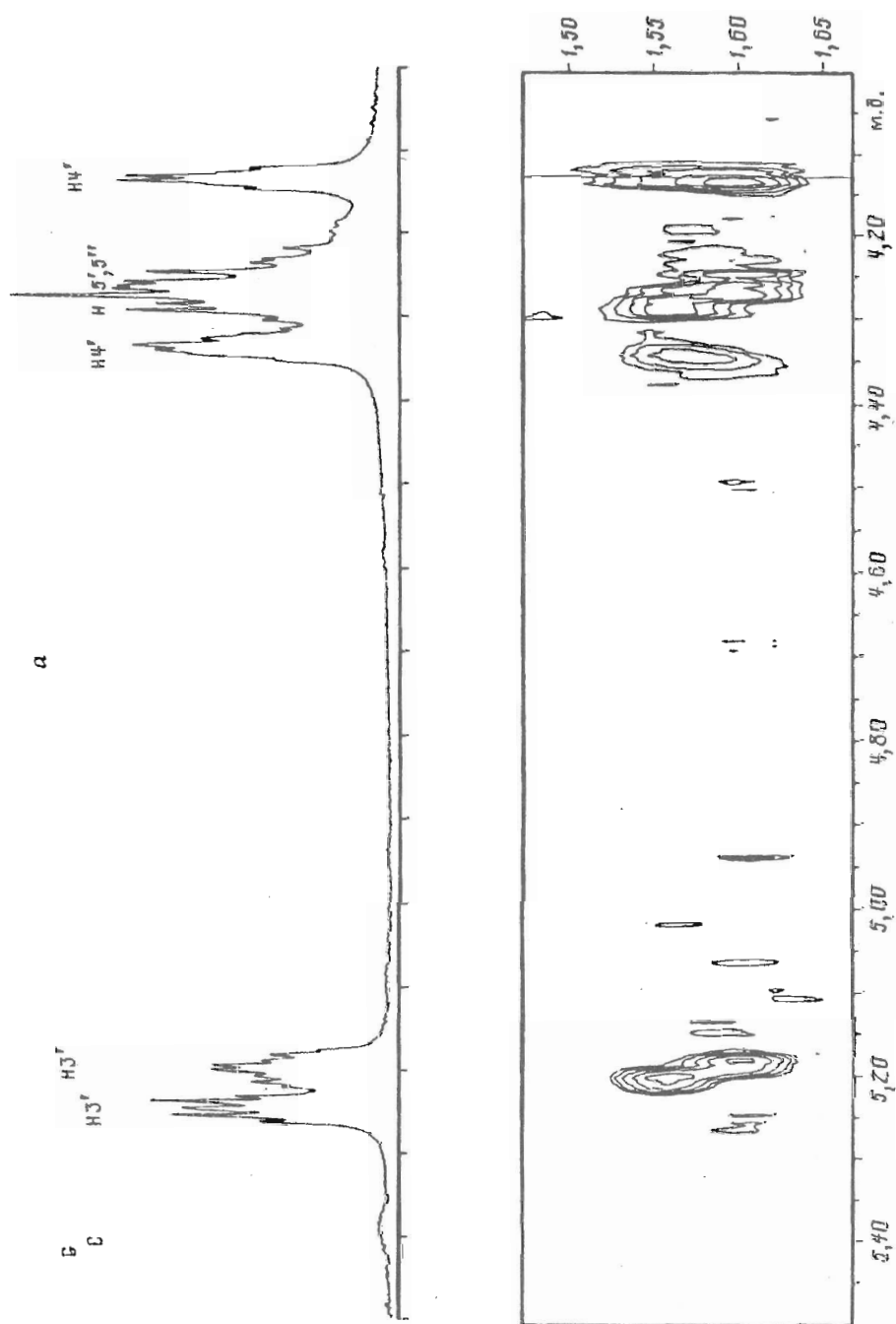


Рис. 5. Фрагменты двумерных спектров КИЭСУ диастереомеров первого (Р<sub>p</sub>) (а) и второго (S<sub>p</sub>) (б) диастереомеров [(MeO)<sub>2</sub>Tl]bGr(CH<sub>3</sub>)bzC(As)

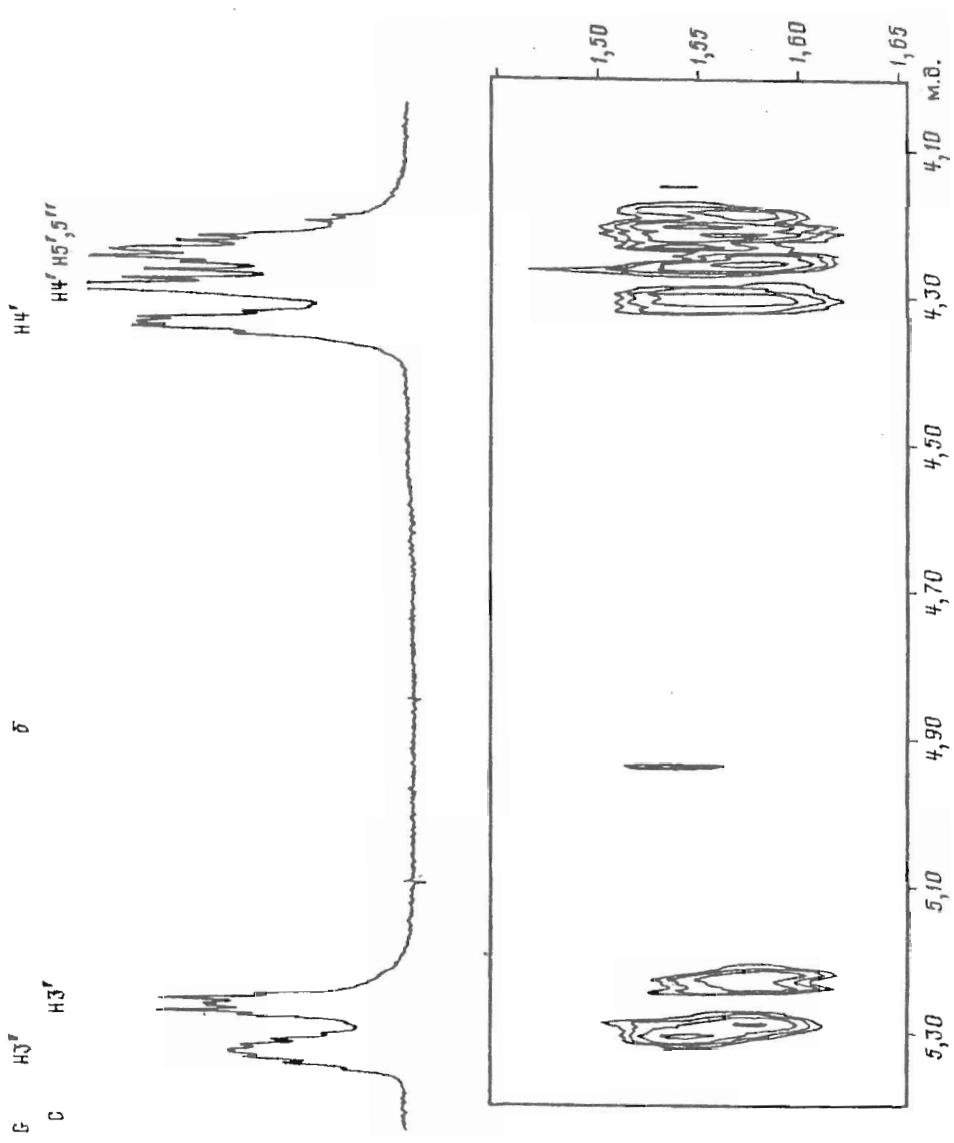


Рис. 3 б

абсолютных конфигураций динуклеозидметилфосфонатов состава АТ [11] и ТТ [5, 9], Лёшнер и Энгельс [10] предположили, что взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протоном Н(4') 5'-нуклеозидного остатка можно считать критерием для установления абсолютных конфигураций других димеров. Наличие этого взаимодействия было приписано R<sub>p</sub>-диастереомеру, а отсутствие (или слабое взаимодействие) — S<sub>p</sub>-диастереомеру. В соответствии с этим правилом были определены конфигурации динуклеозидметилфосфонатов состава ТА, ТТ, АТ, АА и СG [10]. В нашей работе при отнесении абсолютных конфигураций у диастереомеров мы также базировались на данных, опубликованных в литературе (табл. 1). Однако возможность применения единого критерия (Р—СН<sub>3</sub> — Н(4')-взаимодействие) ко всем дезоксидинуклеозидметилфосфонатам нуждалась в экспериментальной проверке, что наряду с поиском новых критериев отнесения абсолютных конфигураций диастереомеров являлось целью настоящей работы.

Для исследования были выбраны полностью защищенные димеры, для которых можно ожидать больших конформационных ограничений, а следовательно, более четких сигналов ROESY, чем для димеров, не содержащих защитных групп. Конформационные ограничения для димеров, очевидно, зависят как от природы нуклеозидных остатков и защитных группировок, так и от конформации при асимметрическом фосфоре метилфосфонатного фрагмента. Следовательно, подобия в проявлении кросс-релаксационных взаимодействий Р—СН<sub>3</sub>-группы и ближайших протонов дезоксирибозы в ряду R- (или S-) диастереомеров дезоксинуклеозидметилфосфонатов можно ожидать для родственных димеров (например, в ряду Р<sub>и</sub>—Р<sub>и</sub> или Р<sub>и</sub>—Р<sub>у</sub> и т. д.). Это и находит отражение в спектрах ROESY димеров. Наблюдается качественная корреляция соответствующих кросс-релаксационных взаимодействий протонов трех различных групп димеров, имеющих общие структурные элементы (табл. 3). Для всех защищенных димеров, содержащих (MeO)<sub>2</sub>Tr- или MeOTr-группу, в спектрах ROESY регистрируется взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы и протонов, входящих в состав тритильных групп. Это свидетельствует о сравнительно небольшом расстоянии между этими группами, а следовательно, указывает на их взаимное влияние. В этом взаимодействии должно участвовать и гетероциклическое основание. Поэтому взаимное пространственное расположение гетероциклического основания, тритильной группы и Р—СН<sub>3</sub>-группы должно определяться в первую очередь природой нуклеозидного остатка.

Детальный анализ спектров всех димеров указывает на то, что критерий, предложенный в работе [10] (более интенсивное взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протоном Н(4') 5'-нуклеозидного остатка для первого изомера (он же R<sub>p</sub>-изомер)), применим для установления абсолютных конфигураций димеров, содержащих на 5'-конце дезоксиаденозин, дезоксигуанозин и в некоторых случаях дезокситимидин. В случае дезоксицитидина наблюдается взаимодействие протонов Р—СН<sub>3</sub>-группы с протонами Н(5', 5'') 5'-нуклеозидного остатка, что, по нашим данным, также является критерием отнесения конфигурации при атоме фосфора первого диастереомера к R<sub>p</sub>, а второго — к S<sub>p</sub>. Последнее правило справедливо и в случае дезокситимидина в качестве 5'-концевого фрагмента, за исключением димера ТС.

Объемные пуриновые основания G- и A-нуклеозидов, взаимодействуя с тритильной группой, заставляют сместиться ее в направлении протона Н(4') 5'-нуклеозидного остатка, ограничивая тем самым подвижность Р—СН<sub>3</sub>-группы вблизи протона Н(4'). В результате в одном из изомеров (R<sub>p</sub>) Р—СН<sub>3</sub>-группа оказывается в удобной ориентации относительно протона Н(4') (т. е. достаточно близко), чтобы взаимодействовать с ним по кросс-релаксационному механизму. В то же время существенные различия во взаимодействии Р—СН<sub>3</sub>-группы с протонами Н(5', 5'') 5'-нуклеозида для диастереомеров не всегда наблюдаются.

В случае, когда 5'-нуклеозидом является С, тритильная группа располагается ближе к гетероциклическому основанию и дальше от протона Н(4'). Это приводит

к большей свободе вращения относительно  $O(3')-P$ -связи, в результате становится возможным взаимодействие протонов  $P-CH_3$ -группы с протоном  $H(4')$   $5'$ -нуклеозида для обоих диастереомеров. С другой стороны, ориентация  $P-CH_3$ -группы относительно протонов  $H(5', 5'')$  становится заметно различной для  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров, и соответствующие кросс-релаксационные взаимодействия наблюдаются теперь только для первого ( $R_p$ ) диастереомера. Ситуация, наблюдающаяся в случае производных с остатком дезокситимидина на  $5'$ -конце, является как бы переходной между теми, когда в том же положении находятся остатки пуринов, с одной стороны, и дезоксицитидина — с другой. Присутствие  $5-CH_3$ -группы дезокситимидина заставляет тритильную группу принять положение, подобное, но не эквивалентное тому, которое она занимала в  $5'$ -пуриновых нуклеозидах. Это, по-видимому, является причиной того, что в спектрах ROESY для  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров с  $5'$ -концевым дезокситимидином наблюдаются различные взаимодействия протонов  $P-CH_3$ -группы как с протоном  $H(4')$ , так и с протонами  $H(5', 5'')$ .

Следует отметить, что при отсутствии тритильной группы (димеры TG, GA) все закономерности кросс-релаксационных взаимодействий, найденные для  $R$ - и  $S$ -диастереомеров тритилсодержащих димеров, сохраняются. Поэтому вопрос: играет ли определяющую роль тритильная группа или гетероциклическое основание в проявлении кросс-релаксационных взаимодействий  $P-CH_3$ -группы и протонов  $H(4')$  и  $H(5', 5'')$ , требует дополнительного исследования.

Представленные нами результаты хорошо коррелируют с работой [17] по синтезу дезоксидинуклеозидметилфосфонатов с помощью метилдихлорфосфина, в результате второй стадии которого (образование диэфира метилфосфонистой кислоты) проходит предпочтительно образование  $R_p$ -изомера. Стереоселективность этой реакции зависит от природы гетероциклического основания  $5'$ -концевого нуклеозида и возрастает в ряду  $(MeOTr)ibG$ ,  $(MeOTr)bzA$ ,  $(Tr)T$ ,  $(Tr)bzC$ . Полученные нами интенсивности сигналов кросс-релаксационных взаимодействий отражают тот же порядок: в ряду димеров, содержащих на  $5'$ -конце  $[(MeO)_2Tr]ibG$ ,  $[(MeO)_2Tr]bzA$ ,  $(MeOTr)T$ ,  $[(MeO)_2Tr]bzC$ , различие в интенсивности взаимодействия  $P-CH_3$ -группы с протонами  $H(5', 5'')$   $5'$ -нуклеозида для  $R_p$ - и  $S_p$ -изомеров увеличивается, а взаимодействие  $P-CH_3$ -группы с протоном  $H(4')$   $5'$ -нуклеозида уменьшается (табл. 2). Логично предположить, что оба эффекта (селективность реакции и различия в величинах кросс-релаксационных взаимодействий) зависят от конформации диастереомеров.

Анализ кросс-релаксационных взаимодействий протонов  $P-CH_3$ -группы с протонами  $3'$ -концевого нуклеозида показывает, что различия для диастереомеров наблюдаются только в случае  $H(3')$ - и  $H(4')$ -протонов пиримидиновых нуклеозидов. Эти взаимодействия всегда более интенсивны для второго, а именно  $S_p$ -изомера. Отсутствие подобной корреляции между изомерами для  $3'$ -пуриновых нуклеозидов, вероятно, следствие изменения конформации фуранозного цикла и (или) торсионных углов относительно  $C(4')-C(5')$ -связи.

Таким образом, можно заключить, что все различия, наблюдаемые в спектрах ROESY для пар диастереомеров, связаны с различиями в их конформации, которая в свою очередь определяется природой гетероциклических оснований в димере.

Результаты исследования диастереомеров динуклеозидметилфосфонатов другими физико-химическими методами, приведенные в нашем предыдущем сообщении [1], и литературные данные (табл. 1) полностью согласуются с выводами, сделанными в настоящей работе, об  $R_p$ -конфигурации для первого и  $S_p$ -конфигурации для второго изомера.

### Экспериментальная часть

ROESY-спектры были получены на спектрометрах Bruker AMX-400, AM-400 и AM-250. Измерения проводили при  $27^\circ C$  после интенсивного барботирования потока сухого азота через ампулу с образцом, растворенным в ацетонитриле- $d_3$ . Концен-

трация образцов составляла ~100 мМ (30 мг образца на 450 мкл CD<sub>2</sub>CN). Химические сдвиги сигналов протонов измеряли относительно внутреннего стандарта — CD<sub>2</sub>HNCN ( $\delta$  1,93 м.д.). Индивидуальное отнесение сигналов диастереотопных протонов Н(5'), Н(5'') обоих углеводных остатков димера не проводили из-за перекрываний и наложенный сигналов. Параметры ROESY-экспериментов были аналогичны использованному в работе [10]. Импульсные программы предоставлены проф. К. Гринингером. Коррекцию базовой линии проводили с использованием программы, предоставленной д-ром И. Циммерманом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вязовкина Е. В., Комарова Н. И., Лебедев А. В. // *Биоорг. химия*. 1993. Т. 19. № 1. С. 86—94.
2. Zon G. // *Pharmaceut. Res.* 1988. V. 5. № 2. P. 539—549.
3. Stein C. A., Cohen J. S. // *Cancer Res.* 1988. Т. 48. № 9. P. 2659—2668.
4. Miller P. S., Yano E., Carrol C., Jayaraman K., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 29. P. 5134—5142.
5. Lesnikowski Z. J., Jaworska-Maslanka M., Stec W. J. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1991. V. 10. № 1—3. P. 733—736.
6. Shishkina I. G., Zarytova V. F. // *Analyt. Biochem.* 1990. V. 188. № 1. P. 214—218.
7. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 20. P. 6268—6275.
8. Smith C. C., Aurelian L., Reddy M. P., Miller P. S., Ts'o P. O. P. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. № 9. P. 2787—2791.
9. Bentrude W. G., Sopchik A. E., Bajwa G. S., Setzer W. N., Sheldrick W. S. // *Acta Cryst.* 1986. V. C42. № 8. P. 1027—1029.
10. Löschner T., Engels W. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 17. P. 5083—5088.
11. Bower M., Summers M. F., Powell C., Shinozuka K., Regan J. B., Zon G., Wilson W. D. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 12. P. 4915—4930.
12. Chacko K. K., Linder K., Saenger W., Miller P. S. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 9. P. 2801—2814.
13. Han F., Watt W., Duchamp D. J., Callahan L., Kezdy F. J., Agarwal K. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 9. P. 2759—2767.
14. Kessler H., Gehrke M., Griesinger C. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988. V. 27. P. 490—536.
15. Воробьев Ю. Н. // *Молекулярн. биология*. 1990. Т. 24. № 1. С. 58—68.
16. Swarna Latha Y., Yathindra N. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1991. V. 13. № 5. P. 301—306.
17. Löschner T., Engels J. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. № 41, P. 5587—5590.

Поступила в редакцию  
22.XI.1991

*E. V. Vyazovkina, I. W. Engels\*, A. V. Lebedev*

### INVESTIGATION OF DIASTEREOMERS OF NON-IONIC OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS

#### VIII. ASSIGNMENT OF ABSOLUTE CONFIGURATIONS OF DIASTEREOMERIC DEOXYDINUCLEOSIDE METHYLPHOSPHONATES BY 2D NMR ROESY SPECTROSCOPY

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Russian Academy of Sciences;*

*\* Institute für Organische Chemie, der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main*

All 16 pairs of diastereomeric deoxydinucleoside methylphosphonates of common formula (DMT)<sub>x</sub>Np(CH<sub>3</sub>)<sub>y</sub>N'(Ac) (where xN and yN' are base protected deoxynucleosides) were studied with the NOE derived ROESY NMR technique. Most of signals in 2D NMR ROESY spectra of diastereomers were assigned, ROE interactions from protons of P—CH<sub>3</sub> group to sugar and base protons were established. The relationships between intensity of characteristic ROE signals and configuration of asymmetric phosphonate fragments were found. The results together with literary, CD- and chromatography data enabled us to deduce the absolute configurations of 32 diastereomers.