中国科学(B 辑)
第25卷 第11期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1995年11月

二尿苷硼烷磷酸酯的合成和性质研究*

陈耀全 屈付成 张一兵
(中国科学院上海有机化学研究所,生命有机化学国家重点实验室,上海 200032)

摘要 合成了磷酸酯基硼烷修饰的二核苷酸二尿苷硼烷磷酸酯,分离了它们的非对映异构体,经蛇毒磷酸二酯酶选择性水解测定了磷原子的构型. 数据表明,较之未修饰的母体化合物二尿苷酸,修饰后的二核苷酸的亲脂性提高了,它们对蛇毒磷酸二酯酶的稳定性更是大为提高.

关键词 二尿苷硼烷磷酸酯 非对映异构体分离 磷原子构型测定 对蛇毒磷酸二酯酶的稳定性

自从发现细胞中存在一种小的RNA分子能够通过碱基配对和DNA的特定顺序结合而具有调控基因表达的功能,反义核酸已成为生物学、医学、化学的重要研究领域. 为了使人工合成的寡核苷酸作为外源性物质对活细胞的基因表达表现反义活性,要求寡核苷酸具有适当的亲脂性,以便能够透过细胞膜; 要求寡核苷酸能抗御核酸酶的攻击,以便能够完整地到达靶位. 目前达到这个目标的主要手段是对寡核苷酸进行化学修饰.

在磷酸基化学修饰的寡核苷酸家族中,硼烷磷酸酯是新成员,还只受到初步的研究[1,2]. 由于^{10}B同位素的以下核反应[3]

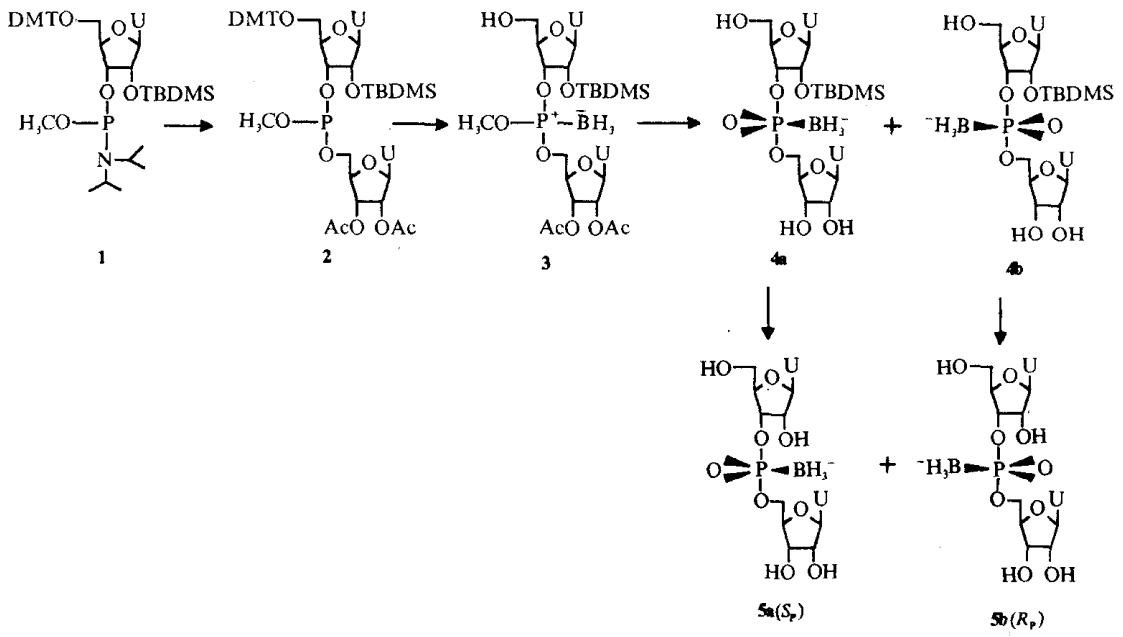
$$^{10}B + {}^{1}n \rightarrow (^{11}B) \rightarrow {}^{7}Li + {}^{4}He + 2.4MeV$$

含硼元素的寡核苷酸有特别的兴趣. 它们除了可能具有一般寡核苷酸的反义活性外,在热中子照射下释放出来的α射线能够切断靶核酸链,因而能够更强地抑制基因表达.

Sood等[1]曾报道二胸苷和三胸苷硼烷磷酸酯的合成,但他们没有分离产物的非对映异构体,因而无法测定它们的构型,研究它们的酶底物性质. 作为寡核糖核苷硼烷磷酸酯的模型化合物,我们合成了二尿苷硼烷磷酸酯,分离了它们的非对映异构体,测定了磷原子的构型,测定并比较了它们和母体化合物二尿苷酸在C_{18}柱上的保留时间和对蛇毒磷酸二酯酶的稳定性.

二尿苷硼烷磷酸酯是按以下反应式合成的:

1994-12-12收稿,1995-06-03收修改稿
*国家攀登计划和国家自然科学基金资助项目



U= 尿嘧啶基
DMT=4,4′-二甲氧三苯甲基
TBDMS= 叔丁基二甲基硅基
Ac= 乙酰基

1 实验部分

4,4′-二甲氧三苯基氯甲烷和叔丁基二甲基氯硅烷为 Aldrich 产品，N,N-二甲基氨基吡啶和氟化四丁铵为 Fluka 产品，1H-四氮唑和硼烷-二甲硫醚复合物为东京化成产品，蛇毒磷酸二酯酶为 Sigma 产品，葡聚糖凝胶 G-10 和 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 为 Pharmacia 产品，高效薄层层析板和柱层析硅胶为青岛海洋化工厂产品．所有溶剂均经无水处理，酶解反应和 HPLC 用水经双蒸去离子．紫外光谱用 HP8451 测定；质谱用 VG Quattro 和 Finigan-MAT 8430 测定；^{1}H NMR, ^{31}P NMR(85% 磷酸为外标)和 ^{11}B NMR(硼酸三甲酯为外标)用 Jeol FX-90Q, Bruker AM-300 和 Bruker AMX-600 测定；HPLC 用 LKB 2151, 在 $\lambda=260$nm 检测，分析柱用 Baker C_{18} 柱(5μ, 4.6mm×250mm)，制备柱用 Waters μBondapek C_{18} 柱，(10μ, 7.8mm×300mm)．5′-O-二甲氧三苯甲基尿苷，5′-O-二甲氧三苯甲基-2′-O-叔丁基二甲基硅烷基尿苷，2′,3′-O-二乙酰尿苷，2′-O-叔丁基二甲基硅烷基-5′-O-二甲氧三苯甲基尿苷-3′-N,N-二异丙基甲基氨基亚磷酸酯(1)，2′-O-叔丁基二甲基硅烷基-5′-O-二甲氧三苯甲基尿苷-(3′→5′)-亚磷酸甲酯-(2′,3′-O-二乙酰)尿苷(2)和二尿苷酸按文献[4~7]方法制备．

1.1 2′-O-叔丁基二甲基尿苷(3′→5′)硼烷磷酰-(2′,3′-O-二乙酰)尿苷甲酯(3)

2′-O-叔丁基二甲基硅烷基-5′-O-二甲氧三苯甲基尿苷-(3′→5′)-亚磷酸甲酯-(2′,3′-O-二乙酰)尿苷(2) (76mg, 0.073mmol)溶于二氯甲烷(6mL)，氮气氛中搅拌下滴加 Me_2S-BH_3 (50μL)．反应混合物在 20～25 ℃ 搅拌，当 TLC(二氯甲烷-甲醇，10: 1, v/v) 显示反应完成

时，减压蒸去溶剂，经硅胶柱纯化（用含 1%～5% 甲醇的二氯甲烷溶液淋洗）得白色无定形固体 **3**，46mg，产率 83%. **3** 的 R_F=0.33（二氯甲烷－甲醇，20:1）.

FAB MS(m/z): 761$(M+H)^+$(4.2%).

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ: 11.465, 11.433 (s, 2H, NH), 7.856, 7.680 (d, 2H, H6, J=8.4, 7.8Hz), 5.899 ～ 5.880 (m,2H,H1′), 5.864, 5.667(d,2H,H5, J=9.6,8.4Hz), 5.476 ～ 5.442 (m,2H,H1′), 4.711 (m,1H,5′-OH), 4.377～4.215 (m,4H,H3′,H4′), 3.726～3.573 (m,4H,H5′), 3.413(s,3H,P-OCH_3), 2.058, 2.027 (s,6H,acetyl), 0.779 (s,9H,Si-t-Bu), 0.376 (br,3H,BH_3), 0.015, −0.045 (s,6H,Si-CH_3).

^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ: 116.94.

^{11}B NMR (DMSO-d_6) δ: −59.33.

元素分析：$C_{29}H_{46}BN_4O_{15}PSi$ 计算值：C,45.79; H,6.05; N,7.37; P,4.07. 实测值：C,45.97; H, 5.68; N,7.42; P,3.65.

1.2　2′-O-叔丁基二甲基硅烷基尿苷(3′→5′)硼烷磷酰尿苷(4)

3(100mg,0.13mmol) 加浓氨水 (3mL) 室温搅拌，TLC（二氯甲烷－甲醇，10:1）表明反应完全后，用氮气驱除氨，然后减压浓缩. 加少量水溶解产物，过滤，清液用 HPLC 分离. 流动相：7mmol/L 磷酸钠 (pH6.86) (70%)－乙腈 (30%). 分别收集 RT=6min 34s 和 RT=8min 13s 的峰，浓缩后用葡聚糖 G-10 柱 (2cm×60cm) 脱盐，流出液分别测定电导率和 A_{260}，合并低电导率高 A_{260} 组分，冷冻干燥，得白色粉末. **4a**16.2mg（产率 18.9%），**4b** 16.2mg（产率 21.3%），总产率 42.0%.

FAB MS (m/z): 661(M^-) (**4a**,52%; **4b**,42%).

4a: ^{31}P NMR (D_2O), δ 94.303, $J_{P,B}$=168Hz; ^{1}H NMR (D_2O), δ0.494 1(d,br,3H,BH_3).

4b: ^{31}P NMR (D_2O), δ 93.874, $J_{P,B}$=160Hz, ^{1}H NMR (D_2O), δ0.450 0(d,br,3H,BH_3).

1.3　二尿苷(3′→5′)硼烷磷酸酯(5a 和 5b)

4a(10mg, 0.015mmol) 在 1mol/L TBAF(2.5mL) 中室温搅拌 9h，将反应液倾入 100mL 水，用乙醚提取数次，水层过 DEAE-葡聚糖 A-25(HCO_3^-型）柱，用 0.4mol/L NH_4HCO_3 洗脱，收集产物部分，冷冻干燥，得 **5a**，白色粉末 6mg，产率 72%. 按相同方法处理，得 **5b**，产率 66%. 数据见表 1.

表 1　5a 和 5b 的数据

化合物	对 SVPDE 的稳定性	^{31}P NMR δ(D_2O)	在 C_{18}HPLC 的 $RT^{a)}$/min$^{a)}$	建议的构型
5a	$t_{1/2}$=80h	94.54, $J_{P,B}$=124Hz	3.23	S_P
5b	$t_{5\%}$=90h	94.38, $J_{P,B}$=155Hz	3.50	R_P

a) 67mmol/L 磷酸钠 (pH6.90) (70mL) +6% 乙腈 (200mL)，流速：1mL/min. 在 λ=260nm 监测

1.4　二尿苷酸(U_pU)，5a, 5b 的 SVPDE 水解

在 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0) (0.5mL) 中加入底物 (U_pU, 2.0×10^{-4}mmol; **5a**, 3.5×10^{-4}mmol; **5b**, 4.2×10^{-4}mmol)，在 37 ℃ 恒温 15min，加入 SVPDE 的甘油液 (10μL，含 0.03 单位)，摇匀后 37 ℃ 温育，按一定时间间隔取样 (20μL)，用 HPLC 分析底物相对含量. HPLC 条件：67mmol/L 磷酸钠 (pH6.90) (70mL) +6% 乙腈 (200mL)，流速 1mL/min，在

$\lambda=260nm$ 监测.

2 结果和讨论

2.1 合成

虽然 Sood 等[1] 曾经报道过二胸苷硼烷磷酸酯的合成,但没有给出反应条件. 在二尿苷硼烷磷酸酯的合成中,**2**→**3** 是关键反应. 在这个反应中,亚磷酸三酯磷原子的孤对电子和硼的缺电子轨道之间形成配位键. 硼烷化试剂 $Me_2S:BH_3$ 具有很强的还原性并对水敏感,这就限制了可用的溶剂种类并且溶剂需要无水. 在条件试验中,我们试验了无溶剂,二氯甲烷或四氢呋喃为溶剂的反应. 温度对这个反应也很重要. 我们得到的最佳反应条件是无水二氯甲烷为溶剂,反应温度为 20～25 ℃. 产物经质谱, ^1H,^{31}P 和 ^{11}B 核磁共振以及元素分析, 证实是化合物 **3**.

2.2 非对映异构体的分离

化合物 **3** 用浓氨水处理同时脱除磷酸酯上的甲基和核糖上的乙酰基生成化合物 **4**. 由于硼烷磷酸酯的磷是手性磷原子,**4** 应该含两个非对映异构体. 二胸苷硼烷磷酸酯的非对映异构体曾在核磁管中被观察到[1], 但从未被分离过. 我们用反相 C_{18}HP LC, 以 67mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.86) (70%) + 乙腈 (30%) 为流动相,得到保留时间 (*RT*) 分别为 3min, 6min 34s, 8min 13s, 和 13min 50s 的 4 个主要组分,其中 6min 34s 和 7min 50s 2 组分的量约为 1:1. 分别收集这2个组分,后处理以后经 HPLC 检查,纯度满意 (图 1). 磷酸钠可以用葡聚糖凝胶 G-10 柱脱除. 6min 34s 的组分定为 **4a**, 8min 13s 的组分定为 **4b**. **4a** 和 **4b** 分别经质谱分

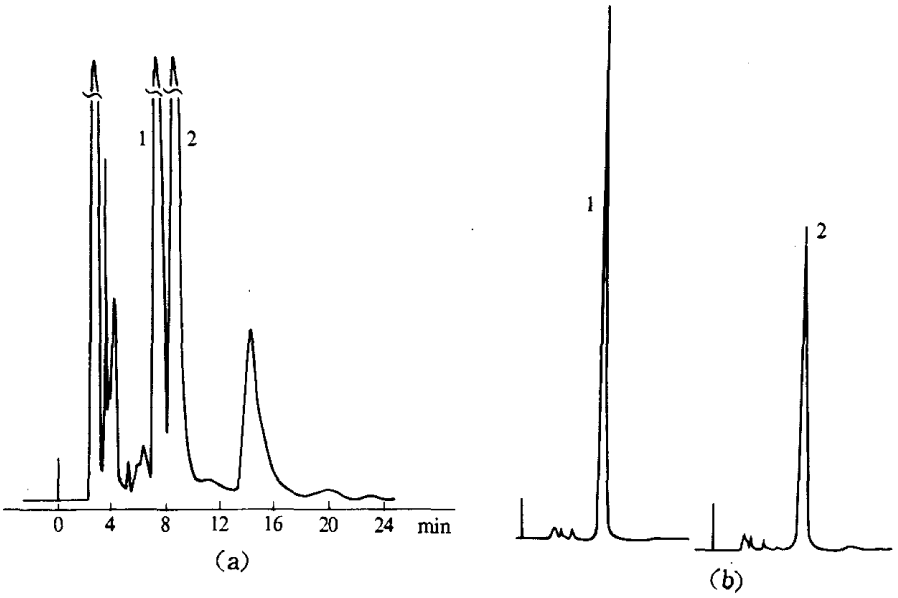


图 1 **4a** 和 **4b** 的 HPLC 分离 (图 (a)) 和分离后的纯度鉴定 (图 (b))

条件见实验部分, 1 为 4a 谱, 2 为 4b 谱

析,得到质荷比相同并和计算值相等的分子离子峰. 结合它们的 ^1H 和 ^{31}P 核磁共振谱,可以确定 **4a** 和 **4b** 是所需的非对映异构体.

2.3 磷原子构型的测定

化合物 **4a** 和 **4b** 用氟化四丁铵脱去核糖上的叔丁基二甲基硅基得到二尿苷硼烷磷酸酯 **5a**

和 **5b**. 这两个化合物中的磷原子的构型需要测定. *R* 构型的 P 原子记为 R_P, *S* 构型的记为 S_P. 起先我们试图用核磁共振 NOE 技术，但由于 BH_3 的质子给出很宽的信号而未能成功. 在化学修饰的寡核苷酸中，研究得最为深入的核苷硫代磷酸酯的 P 原子构型曾用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPDE) 对于不同构型的硫代磷酸酯的选择性水解来测定. R_P 异构体的水解速度大大高于 S_P 异构体. 这个方法得到的结果和单晶 X 射线衍射法的结果是一致的[8]. 不同构型的硫代磷酸酯的一些理化性质也有规律，例如，R_P 异构体具有较高场的 ^{31}P 核磁共振化学位移，在 C_{18} 反相 HPLC 柱上的保留时间较短；而 S_P 异构体则相反[8~11]. 在比较磷酸酯，硫代磷酸酯和硼烷磷酸酯的结构式时，可以看到它们具有等电子结构 (图 2). 因而，我们设想 SVPDE 对 **5a**

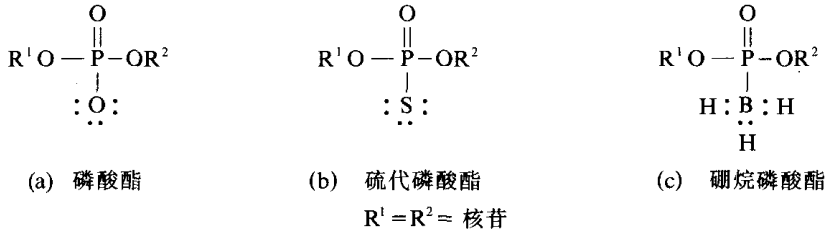


图 2　磷酸酯，硫代磷酸酯和硼烷磷酸酯的等电子结构

和 **5b** 也会有某种程度的选择性水解. 实验结果是：**5a** 的半水解时间 ($t_{1/2}$) 是 80h, 而 **5b** 的 5% 水解时间 ($t_{5\%}$) 则是 90h. 并且，它们的水解速度和 ^{31}P 核磁共振的化学位移和 C_{18}HPLC 保留时间也表现出和硫代磷酸酯相同的关联. (表 1) 因此，我们用间接的方法初步测定了 **5a** 和 **5b** 中磷原子的构型. 按照 Prelog 规则，具有相同电子结构的硫代磷酸酯应该具有相反的构型. 因此，**5a** 可定为 S_P 构型，而 **5b** 则为 R_P 构型.

2.4　二尿苷酸，5a 和 5b 的酶稳定性和亲脂性

化学修饰寡核苷酸的目的是提高它们的亲脂性和对核酸酶的稳定性. 图3是未修饰的母体化合物二尿苷酸 (U_PU) 和修饰化合物 **5a** 和 **5b** 的 SVPDE 水解的时间曲线. 在相同条件下，U_PU 在 C_{18} 柱上的 *RT* 是 2.9min, $t_{1/2}$ 是 7min; **5a** 的 *RT* 是 3.23min, $t_{1/2}$ 是 80h; **5b** 的 *RT* 是 3.50min, $t_{5\%}$ 是 90h. 因此，**5a** 和 **5b** 的亲脂性高于 U_PU, 它们对 SVPDE 的稳定性更是大大提高了.

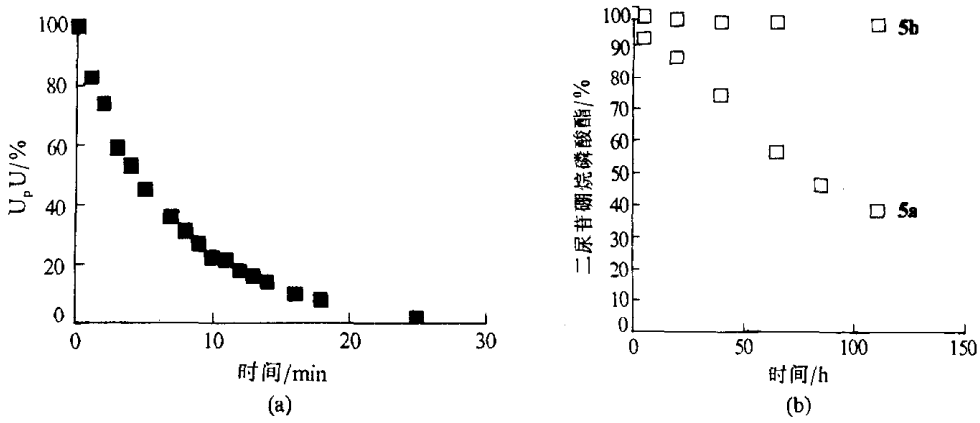


图 3　U_PU(图 (a)), 二尿苷硼烷磷酸酯 S_P 异构体 (**5a**) 和 R_P 异构体 (**5b**) (图 (b)) 的SVPDE 水解反应时间曲线

条件见实验部分

参 考 文 献

1 Sood A, Shaw B R, Spielvogel B F. Synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates. J Amer Chem Soc, 1990, 112: 9 000～9 001

2 Tomasz J, Shaw B R, Poter K *et al*. 5′-P-Substituted thymidine monophosphate and triphosphate. Angew Chem Int Ed Engl, 1992, 31: 1 373～1 375

3 Soloway A H. Boron Chemistry. New York: The MacMillan Co, 1964. 1: 203～224

4 Hakimelahi G H, Proba Z A, Ogilvie K K. New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides. Can J Chem, 1982, 60: 1 106～1 113

5 Matsuda A, Shinozaki M, Watanabe K *et al*. A convenient method for the selective acylation of guanine nucleoside. Synthesis, 1986, 385～386

6 Nielson J, Taagaard M, Marrug J E *et al*. Application of 2-cyanoethyl *N*, *N*, *N′*, *N′* tetraisopropylphosphorodiamidite for in situ preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites. Nucl Acids Res, 1986, 14: 7 393～7 400

7 Usman N, Ogilvie K K, Jiang M-Y *et al*. Synthesis of a 43-nucleotide sequence similar to the 3′-half molecule of an *E. coli* formylmethionine tRNA. J Amer Chem Soc, 1987, 109: 7 845～7 854

8 Burgers P M J, Sathyanarayana B K, Saenger W *et al*. Crystal and molecular structure of adenosine 5′-*O*-phosphorothioate *O*-*P*-nitropheny ester (Sp diastereomer). Eur J Biochem, 1979, 100: 585～591

9 Stec W J, Zon G, Uznanski B. Reversed-phase HPLC separation of diastereomeric analogues of oligodeoxyribonucleotides and other backbone-modified congeners of DNA. J Chronatogr, 1985, 326: 263～280

10 Koziolkiewicz M, Uznanski B, Stec W J *et al*. *P*-chiral analogs of oligodeoxynucleotides: synthesis, stereochemistry and enzyme studies. Chem Scr, 1986, 26: 251～260

11 Seela F, Kretschmer U. Diastereomerically pure R_P and S_P dinucleoside *H*-phosphonates: The stereochemical course of their conversion into *P*-methylphosphonates, phosphorothioates, and [^{18}O] chiral phosphates. J Org Chem, 1991, 56: 3 861～3 869