



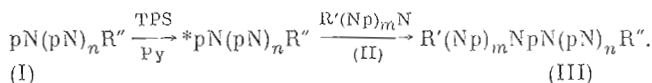
УДК 547.963:542.953.2

ЗАЩИТА МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ФОСФОДИЭФИРНЫХ ГРУПП И СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ ИЗ Р-ЗАЩИЩЕННЫХ БЛОКОВ

*Быстров Н. С., Добрынин В. Н., Колосов М. Н.,
Чернов В. К.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

При синтезе олигодезоксинуклеотидов традиционным диэфирным методом 5'-концевой фосфат Р-компонента (I) активируют в пиридиновом растворе, обычно триизопропилбензолсульфохлоридом (TPS), и конденсируют с 3'-гидроксиллом ОН-компонента (II) [1]. Однако в условиях этих реакций 3'-ОН является более слабым нуклеофилом по отношению к активированному фосфату (*р), чем фосфодиэфирные группы (р), имеющиеся в исходных веществах (I), (II) и продукте конденсации (III). По этой причине активация Р-компонента и последующая конденсация с ОН-компонентом протекают с образованием различных пиродифосфатов [2] в качестве промежуточных и побочных продуктов, что в конечном итоге приводит к непроизводительному расходу (I) и (II) и снижению выхода (III), особенно в случае высших олигонуклеотидов.

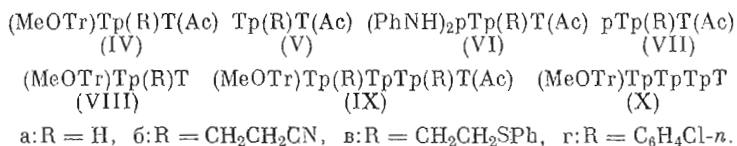


Для устранения этих недостатков диэфирного метода нами разработаны два способа блокирования фосфодиэфирных групп в Р- и ОН-компонентах на примере получения «тимидиновых двоек» (VII), (VIII) и показано, что применение таких Р-защищенных блоков позволяет значительно повысить выход при межнуклеотидной конденсации. В качестве защит при этом использовались β-цианэтильная группа, очень легко удаляющаяся из фосфотриэфиров при действии оснований, а также две более устойчивые группы — β-фенилтиоэтильная и *n*-хлорфенильная.

Нами было найдено, что блокирование межнуклеотидного фосфата (все эти реакции проводились в безводном пиридине при 20°) взаимодействием с цианэтанолом в присутствии TPS протекает медленно и с невысоким выходом; например, при 6 моль TPS реакция (IVa) → (IVб) не заканчивается даже за 3 сут. Если же соединения (IVa) обработать 2 моль фенилфосфата, предварительно активированного в течение 2 ч 6 моль TPS, а затем прибавить избыток (10 моль) цианэтанола, то уже через 20 ч выход продукта (IVб) достигает 80% (выделен хроматографией на силикагеле; здесь и далее указаны препаративные выходы хроматографически индивидуальных веществ, а не содержание продуктов в реакционных сме-

сах). Этим же методом, при замене цианэтанола на фенилтиоэтанол или *n*-хлорфенол, были получены с выходом 60% фосфотриэфиры (IV в) и (IV г); строение соединений (IVб-г) было доказано спектрами ЯМР и гидролизом до фосфодиаэфиров (IVа) и (VIIIа).

Превращение соединений (IV) в 5'-фосфаты (VII) было осуществлено последовательным действием 80% AcOH, (PhNH)₂POCl + Py и Am⁴ONO в смеси AcOH — Py, 1 : 1. Промежуточные продукты детритилирования (Vб-г) и фосфорилирования (VIб-г) были выделены адсорбционной хроматографией с выходом 90—95%. Для очистки же 5'-фосфатов (VIIб-г) потребовалась ионообменная хроматография, и, несмотря на мягкие условия (DEAE-целлюлоза, триэтиламмонийацетатный буфер, pH 7,0), при этом происходило практически полное отщепление CNEt-группы от (VIIб), в то время как (VIIв-г) не расщеплялись и были получены с выходом до 60%.



Второй метод защиты межнуклеотидных фосфатных групп основан на применении более мягкого, чем TPS, Р-активирующего средства — *n*-нитробензолсульфонилтриазиолида (NBST) [3]. Мы нашли, что при действии на (IVа) 8 моль этого реагента и 8—10 моль циан- или фенилтиоэтанола или хлорфенола в течение 2 сут получаются соответствующие фосфотриэфиры (IVб-г) с выходом 80—85%. Поскольку NBST лишь медленно реагирует со спиртами в пиридиновом растворе, он пригоден также для блокирования межнуклеотидных фосфодиаэфирных групп в 3'-незащищенных динуклеозидфосфатах, и с его помощью описанным выше способом из (VIIIа) были синтезированы с выходом 70—75% Р-защищенные 3'-оксисоединения (VIIIб-г).

Конденсация Р-защищенных блоков (VIIг) и (VIIIг) в присутствии TPS (молярное соотношение 2 : 1 : 2) привела после обычной обработки к образованию Р-защищенного тетрануклеозидтрифосфата (IX г) (выход 70%), строение которого было доказано превращением в (X) после удаления 3'-О- и Р-защитных групп водно-диоксановым 0,125 *n*. NaOH. При аналогичной конденсации Р-незащищенных блоков (VIIа) и (VIIIа) в тех же условиях и в том же масштабе выход (X) составлял только 30—40%, т. е. оказался вдвое ниже, чем в предыдущем случае.

Таким образом, описанные выше методы позволяют вводить в межнуклеотидные фосфаты ряд защитных групп, различающихся по своей устойчивости и условиям удаления, и дают возможность препаративно получать Р-защищенные блоки, применение которых существенно повышает выход в олигонуклеотидном синтезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kossel H., Seliger H. (1975) Fortschr. Chem. org. Naturst., 32, 297—508.
2. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Resvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) Tetrahedron, 30, 3073—3079.
3. Katagiri N., Itakura K., Narahg S. A. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332—7337.

Поступила в редакцию
26.IV.1976