



УДК 547.963.320.7 + 543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВXII *. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОДИЭФИРНЫХ ГРУПП
ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ СО СПИРТАМИ И АМИНАМИ
В ПРИСУТСТВИИ КОНДЕНСИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ПО ДАННЫМ ^{31}P -ЯМР*Зарьтова В. Ф., Шецегова Е. А.**Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Методом импульсной спектроскопии ^{31}P -ЯМР исследованы реакции блокирования ФДЭ-групп олигодезоксинуклеотидов. Показано, что взаимодействие (Tr) TrT(As) с β -цианэтанолом в присутствии TPS или с анилином в присутствии пары трифенилфосфин — CCl_4 протекает через промежуточное образование P^1, P^2 -бис-5'-O-триптилтимидин- P^1, P^2 -бис-3'-O-ацетилтимидин-5'-пирофосфата, который далее превращается в β -цианэтиловый эфир или соответственно анилид (Tr) TrT(As). Найдено, что взаимодействие (Tr) TrT(As) с β -цианэтанолом или фенилтиоэтанолом в присутствии MST осуществляется по двум направлениям: через тетразамещенный пирофосфат и триазолид (Tr) TrT(As), причем первый путь является преимущественным. Блокирование ФДЭ-групп триянклеозиддифосфата (Tr) TrTrT(As) фенилтиоэтанолом в присутствии MST протекает в основном через промежуточное образование соединений, содержащих тетразамещенные пирофосфатные группировки, в том числе и внутримолекулярные циклические пирофосфаты.

Ранее при исследовании механизма образования межнуклеотидной связи диэфирным методом [2—5] было установлено, что этот процесс существенно усложняется из-за участия ФДЭ-групп в реакциях с активными производными нуклеотидного компонента, в результате которых образуются малоактивные тризамещенные пирофосфаты [4—6], а также в реакциях с арилсульфохлоридом, приводящих к образованию тетразамещенных пирофосфатов [3, 4, 7] либо внутримолекулярных циклических пирофосфатов [1]. Для устранения указанных побочных процессов проводили блокирование межнуклеотидных ФДЭ-групп путем их этерификации спиртами в присутствии TPS, *n*-нитробензолсульфотриазолида [7—10] либо через промежуточное образование имидазолидов [11]. Описано также обратимое блокирование ФДЭ-групп с помощью дициклогексилкарбодимида [12].

* Сообщение XI см. [1]. Сокращения: ФДЭ-группы — фосфодиэфирные группы, TPS — тризопропилбензолсульфохлорид, MST — мезитиленсульфотриазолид. Проставка d в обозначении производных дезоксинуклеотидов введено опущена. Остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC—IUB (1971) J. Mol. Biol., 55, 299.

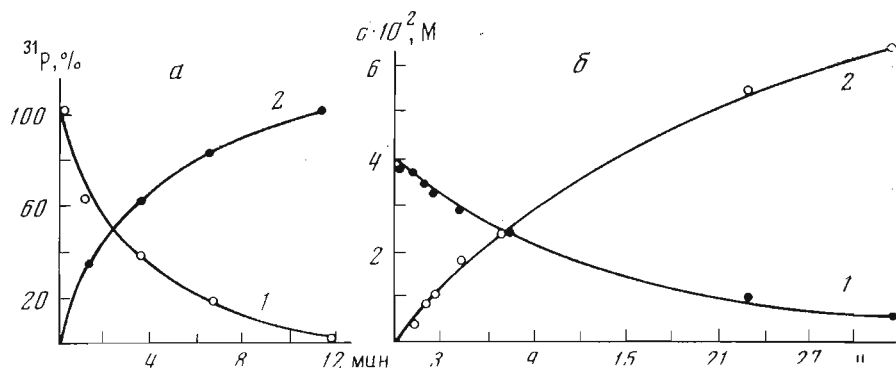


Рис. 1. *a* — кинетические кривые взаимодействия 0,10 М динуклеозидфосфата (II) с 2 экв. TPS при 28°: 1 — расходование динуклеозидфосфата (II), 2 — накопление пирофосфата (I); *б* — кинетические кривые взаимодействия тетразамещенного пирофосфата (I) с β-цианэтанолом (0,22 М) при 30°. Соединение (I) было получено при взаимодействии 0,077 М динуклеозидфосфата (II) с 2 экв. TPS в течение 20 мин. 1 — расходование пирофосфата (I), 2 — накопление триэфира (III)

Целью данной работы является исследование механизма блокирования межнуклеотидных ФДЭ-групп с помощью спиртов и аминов в присутствии конденсирующих агентов. Работа выполнена с использованием метода импульсной спектроскопии ^{31}P -ЯМР. Блокирование осуществлялось с помощью β-цианэтанолол, фенолтиоэтанолол и анилина. В качестве конденсирующих агентов использованы TPS, MST и пара трифенилфосфин — CCl_4 .

При реакции динуклеозидфосфата (II) (см. схему) с 2 экв. TPS и 2 экв. β-цианэтанолол в спектре ^{31}P -ЯМР через 24 ч исчезает сигнал межнуклеотидного фосфата (δ 0,9 м.д.) и регистрируются две пары близко расположенных сигналов с центрами при 2,5 и 13,8 м.д. Наличие двух близко расположенных сигналов характерно для соединений, представляющих собой смесь диастереомеров с асимметрическими атомами углерода в остатке дезоксирибозы и фосфора [2, 13]. При следующих записях спектров ^{31}P -ЯМР наблюдается уменьшение сигнала с δ 13,8 м. д. и возрастание сигнала с центром при 2,5 м.д., который становится практически единственным через 3 сут. Сигнал с центром 13,8 м. д. на основании данных о взаимодействии динуклеозидфосфата (II) с TPS [3] отнесен к тетразамещенному пирофосфату (I). Сигнал с центром при 2,5 м. д. отнесен к цианэтиловому эфиру динуклеозидфосфата (III), так как он находится в области, характерной для алифатических эфиров фосфорной кислоты [14]. Продукт имеет нулевую электрофоретическую подвижность, что согласуется с идентификацией его как соединения (III). Из полученных данных следует, что динуклеозидфосфат (II) вступает в реакцию с TPS с образованием соединения (I), взаимодействие которого с β-цианэтанолол приводит к одной молекуле эфира (III) и регенерации одной молекулы динуклеозидфосфата (II). Последний снова вступает в реакцию с конденсирующим агентом с образованием соединения (I).

При реакции динуклеозидфосфата (II) с TPS время полупревращения в соединение (I) составляет несколько минут; с другой стороны, время полупревращения соединения (I) при реакции с β-цианэтанолол — порядка 10 ч (рис. 1). Значение константы скорости k для реакции образования фосфотриэфира (III) было рассчитано из приведенных кинетических кривых методом численного интегрирования по формуле

$$k = \frac{x}{\int_0^x \frac{1}{[I]([NCC_2H_4OH]_0 - x)} dx}$$

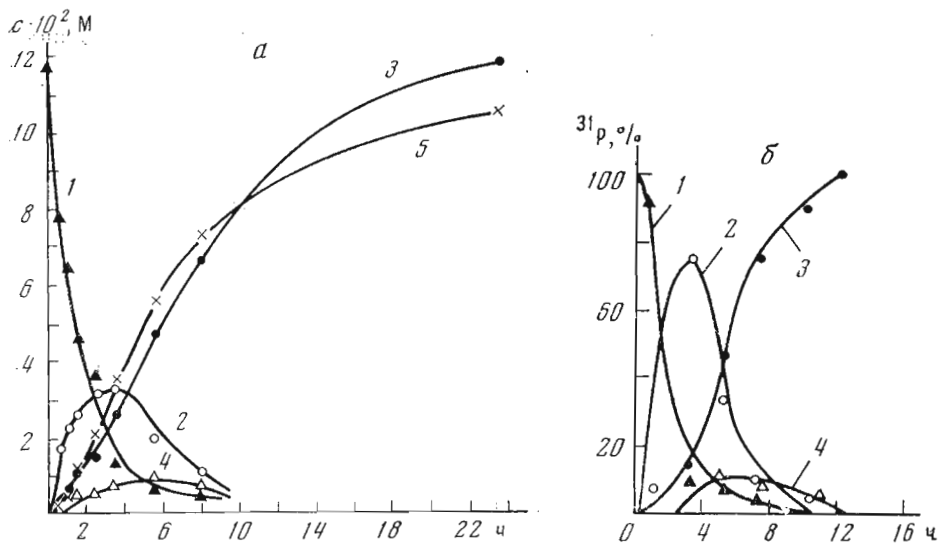
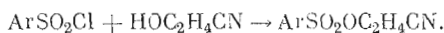


Рис. 2. Кинетические кривые взаимодействия 0,12 М динуклеозидфосфата (II) с 5 экв. MST и 7 экв. β -цианэтанола при 30° (а) и 0,07 М динуклеозидфосфата (II) с 5 экв. MST и 7 экв. β -цианэтанола при 50° (б): 1 — расходование динуклеозидфосфата (II), 2 — накопление и расходование пиррофосфата (I), 3 — накопление диэтилового эфира (III), 4 — накопление и расходование триазолида (V), 5 — расчетная кривая накопления триэфира (III)

где x — текущая концентрация фосфотриэфира (III). Результаты двух параллельных экспериментов, проведенных при 30°, дали значения $1,4 \cdot 10^{-4}$ и $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Казалось бы, с увеличением концентрации спирта должно ускориться накопление триэфира (III). Однако при использовании больших избытков цианэтанола (5 экв.) не происходит количественного образования триэфира. В спектрах ^{31}P -ЯМР конечной реакционной смеси (48 ч) регистрируется сигнал исходного динуклеозидфосфата (II), что указывает на отсутствие конденсирующего агента в реакционной смеси. Это скорее всего связано с тем, что TPS был израсходован на образование арилсульфоэфира в результате реакции с β -цианэтаноном:

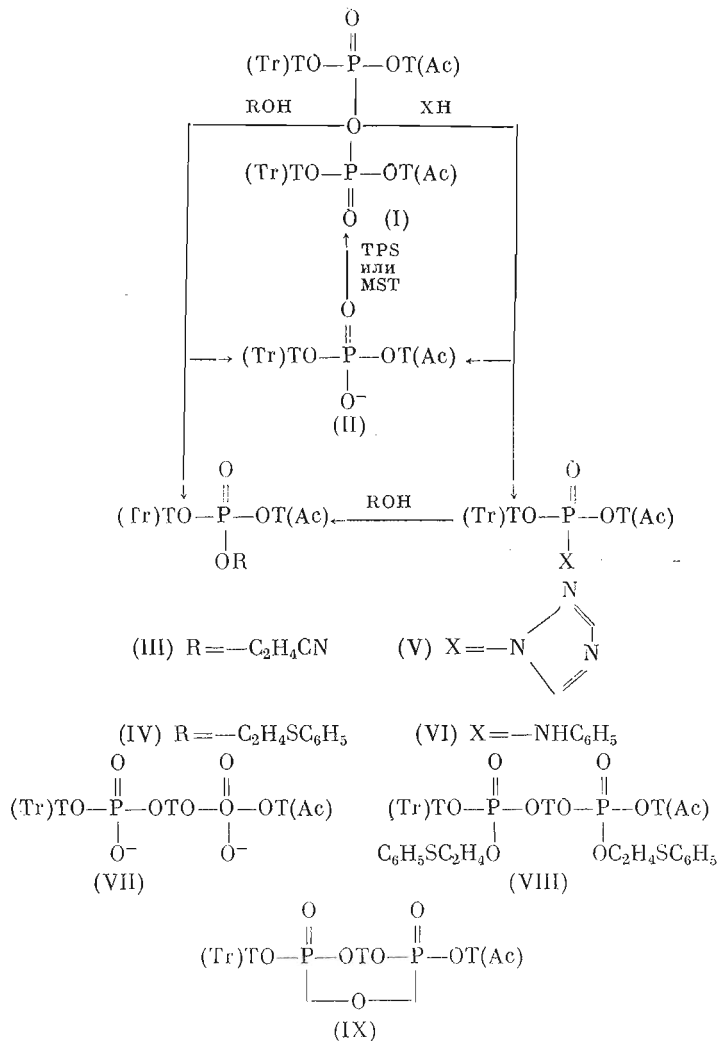


Таким образом, при блокировании ФДЭ-групп использование больших избытков цианэтанола нежелательно.

Мы исследовали также блокирование межнуклеотидной фосфатной группы динуклеозидфосфата (II) в присутствии MST, поскольку с этим реагентом в меньшей степени происходит сульфонилирование гидроксильной группы нуклеозидного компонента [15, 16].

При обработке динуклеозидфосфата (II) MST и β -цианэтаноном в спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси кроме сигналов пиррофосфата (I) (δ 13,8 м. д.) и триэфира (III) (δ 2,5 м. д.) появляется сигнал с δ 10,5 м. д. Такой же сигнал регистрируется при обработке пиррофосфата (I) триазолом. Поскольку известно, что при действии на тетразамещенные пиррофосфаты аминов образуются амиды диэфиров [3, 17], сигнал с δ 10,5 м. д. можно отнести к триазолиду (V). По аналогии с данными для имидазолида (Tr)TrT(Ac) [17] можно предположить, что триазолид (V) является активным производным (Tr)TrT(Ac) и остаток триазола может заменяться на остаток β -цианэтанола. При реакции динуклеозидфосфата (II) с MST и β -цианэтаноном в спектрах ^{31}P -ЯМР реакционной смеси наблюдается постепенное исчезновение сигналов соединений (I) и (V) и увеличение интенсивности сигнала триэфира (III), который становится практически единственным через 24 ч при 30° или через 12 ч при 50° (рис. 2).

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить следующую схему превращений:



Динуклеозидфосфат (II) взаимодействует с конденсирующим агентом MST. Полученный в результате этого тетразамещенный пирофосфат (I) атакует β -цианэтанолом с образованием фосфотриэфира (III). Выделяющаяся при этом молекула исходного динуклеозидфосфата (II) снова вступает в реакцию с MST с образованием пирофосфата (I). В ходе реакции MST превращается в мезитиленсульфокислоту и триазол. Последний в свою очередь может реагировать с тетразамещенным пирофосфатом (I). Образовавшийся триазолид (V) реагирует с β -цианэтанолом, превращаясь в триэфир (III). Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что триазолид (V) в системе не накапливается более чем на 15%.

Чтобы оценить долю триэфира (III), получающегося по каждому из двух возможных путей, мы рассчитали количество триэфира, образующегося непосредственно из пирофосфата (I) в условиях эксперимента, проведенного при 30° (рис. 2а), воспользовавшись найденным средним значением константы скорости $k = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ по формуле

$$x = k \int_0^t [I] ([\text{CNC}_2\text{H}_4\text{OH}]_0 - x) dt.$$

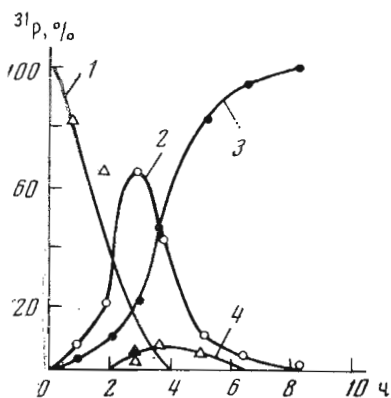


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые взаимодействия 0,07 М динуклеозидфосфата с 5 экв. MST и 7 экв. фенилтиоэтанола при 50°: 1 — расходование динуклеозидфосфата (II), 2 — накопление и расходование пирофосфата (I), 3 — накопление фенилтиоэтилового эфира (IV), 4 — накопление и расходование триазолида (V)

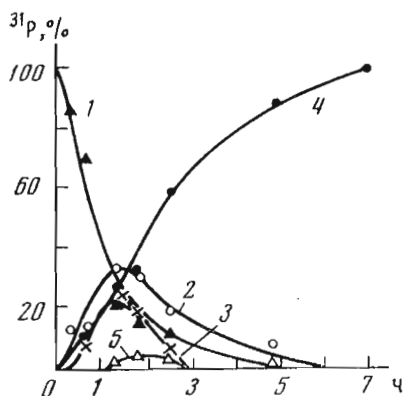


Рис. 4

Рис. 4. Кинетические кривые взаимодействия 0,1 М тринуклеозиддифосфата (III) с 5 экв. MST и 7 экв. фенилтиоэтанола при 50°: 1 — расходование тринуклеозиддифосфата (VII), 2 — интенсивность сигнала при 13,9 м. д., 3 — интенсивность сигналов при 15—19 м. д., 4 — накопление ФДЭ-групп тринуклеозиддифосфата, блокированных остатком фенилтиоэтанола, 5 — интенсивность сигнала при 10,5 м. д.

Расчетная кривая приведена на рис. 2а. Видно, что экспериментальная и расчетная кривые накопления триэфира (III) различаются незначительно. Это свидетельствует о том, что в исследуемых условиях основным путем образования фосфотриэфира является взаимодействие соединения (I) со спиртом.

В исследуемых условиях блокирование ФДЭ-групп β-цианэтанолом в присутствии TPS или MST протекает практически количественно.

Удаление цианэтильной защиты триэфира (III) проведено путем обработки реакционной смеси концентрированным аммиаком при 50° в течение 1 ч. При этом единственным нуклеотидным продуктом, по данным ³¹P-ЯМР и ТСХ, является (Tr)TrT.

Кроме цианэтильной группы мы исследовали введение фенилтиоэтильной защитной группы, стабильной в кислых и щелочных средах и удаляемой только после окисления [18, 19]. В спектрах ³¹P-ЯМР реакционной смеси при взаимодействии динуклеозидфосфата (II), MST и фенилтиоэтанола помимо сигналов исходного динуклеозидфосфата (II) (0,9 м.д.), его триазолида (V) (10,5 м.д.) и пирофосфата (I) (13,8 м.д.) были зарегистрированы два близко расположенных сигнала с центром при δ 2,2 м.д. Эти сигналы были отнесены к фенилтиоэтиловому эфиру (IV). Из рис. 3 видно, что последовательность превращений динуклеозидфосфата (II) в данном случае аналогична приведенной выше для реакции с β-цианэтанолом. Полученные данные позволяют заключить об общности механизма образования фосфотриэфиров в присутствии MST. Из кинетических кривых рис. 3 видно, что за 10 ч блокирование ФДЭ-группы динуклеозидфосфата (II) остатком фенилтиоэтанола протекает практически количественно. После удаления ацетильной защиты фосфотриэфир был выделен адсорбционной хроматографией на силикагеле. Удаление фенилтиоэтильной защиты проводили окислением тиогруппы иодной кислотой (H₅IO₆) с последующей обработкой щелочью [20]. При этом единственным продуктом нуклеотидной природы (по данным ТСХ) был (Tr)TrT.

В этих же условиях (5 экв. MST и 7 экв. фенилтиоэтанола, 50°) было исследовано блокирование ФДЭ-групп тринуклеозиддифосфата (VII) (см.

**Характеристика продуктов взаимодействия (Tr)TrT(Ac) (II) и
(Tr)TrTrT(Ac) (VII) со спиртами и анилином**

Соединение	Сигнал ³¹ P (δ, м.д.)	E _f	R _f в системах			
			А	Б	В	Г
Цианэтиловый эфир (Tr)TrT(Ac) (III) *	2,5 2,6	0		0,68	0,52	0,86
Фенилтиоэтиловый эфир (Tr)TrT(Ac) (IV) *	2,2 2,3	0	0,96	0,88	0,82	
Фенилтиоэтиловый эфир (Tr)TrT Фенилтиоэтиловый эфир (Tr)TrTrT(Ac) (VIII) **	— 2,1–3,1	0 0	0,56 0,56	0,67	0,78	
Фенилтиоэтиловый эфир (Tr)TrTrT ** Анилид (Tr)TrT(Ac) (VI) *	2,1–3,1 –2,6 –2,8	0 0	0,5 0,84		0,59	
Анилид (Tr)TrT	—	0	0,79			

* Два сигнала.

** Мультиплет.

рис. 4, кривые 1 и 4). После окончания реакции триэфир (VIII) был выделен с помощью хроматографии реакционной смеси на силикагеле и охарактеризован ТСХ, электрофорезом (таблица) и ³¹P-ЯМР-спектром (рис. 5). Мультиплетность сигнала в ³¹P-ЯМР-спектре этого соединения скорее всего обусловлена наличием изомеров [2, 6, 13].

На промежуточных стадиях исследуемой реакции регистрируются сигналы при 10,5; 13,9 м. д. и группа сигналов в области 15–19 м. д. По аналогии с вышеизложенными данными первый сигнал, по-видимому, относится к фосфодиэфирным группам, блокированным триазолом, второй — к тетразамещенным пирофосфатным группам. Сигналы в области 15–19 м. д. по аналогии с данными, полученными при взаимодействии тринуклеозиддифосфата (VII) с TPS [1], можно отнести к циклическому внутримолекулярному пирофосфату (IX). Кинетические кривые интенсивности этих трех групп сигналов (рис. 4) показывают, что в данном случае процесс блокирования ФДЭ-групп более сложен, чем в случае блокирования одной ФДЭ-группы (ср. рис. 3 и 4), и протекает в основном через промежуточное образование внутри- и межмолекулярных пирофосфатов.

При синтезе олигонуклеотидов для защиты ФДЭ-групп удобно иметь фосфамидные кислотолabile защитные группы, устойчивые в условиях удаления наиболее употребляемых ацильных защит по гетероциклическому основанию и оксигруппе дезоксирибозы. Однако их введение с помощью TPS или MST затруднительно. Блокирование ФДЭ-групп динуклеозидфосфата (II) анилином мы осуществили в присутствии смеси трифенилфосфина и четыреххлористого углерода. Эти реагенты были успешно применены для синтеза дианилидов мононуклеотидов в работе [21]. На рис. 6 представлен спектр реакционной смеси. Сигналы в области –30, –20 м. д. относятся к продуктам превращения трифенилфосфина [21]. Сигнал при 6,1 м.д. отнесен к исходному трифенилфосфину, а сигнал при 13,8 м. д.— к соединению (I). Два близко расположенных сигнала с δ –2,7 м. д. отнесены к анилиду (VI). Наличие двух сигналов для одного ³¹P, как в случае соединений (III) — (V), обусловлено существованием этого соединения в виде смеси диастереоизомеров [2, 6, 13]. Из кинетических кривых рис. 7 видно, что блокирование ФДЭ-групп протекает через промежуточное образование тетразамещенного пирофосфата (I). Механизм образования тетразамещенных пирофосфатов из диэфиров фосфорной кислоты с помощью смеси трифенилфосфина и CCl₄ обсужден в работе [22].

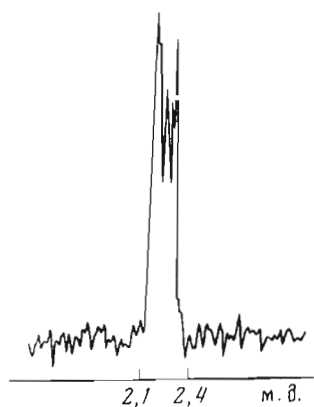


Рис. 5

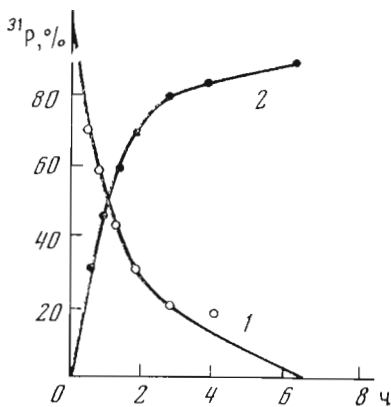


Рис. 7

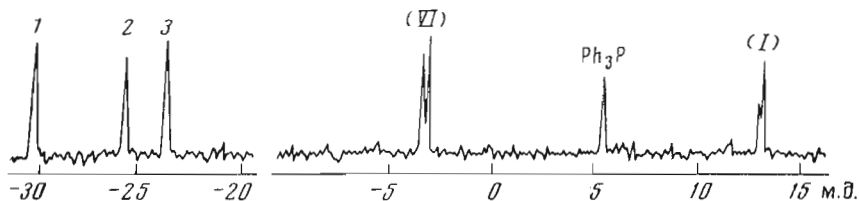


Рис. 6

Рис. 5. Спектр ^{31}P -ЯМР фенилтриэтилового эфира (Tr)TrTrT

Рис. 6. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии 0,07 М тринуклеозиддифосфата (VII) с 7 экв. трифенилфосфина, 7 экв. четыреххлористого углерода и 10 экв. анилина через 2 ч от начала реакции. Сигналы 1, 2, 3 в работе [24] отнесены к $[\text{Ph}_3\text{PNHPh}]^+\text{Cl}^-$, Ph_3PO и $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Cl}]^+\text{Cl}^-$ соответственно

Рис. 7. Кинетические кривые расходования пирофосфата (I) и накопления анилида (VI) в процессе взаимодействия динуклеозидфосфата с 7 экв. четыреххлористого углерода и 10 экв. анилина при 22°: 1 — расходование пирофосфата (I), 2 — накопление анилида (VI) (за 100% ^{31}P принята суммарная интегральная интенсивность сигналов при δ — 2,7 и 13,8 м. д.)

Удаление анилидной защиты с ФДЭ-групп проведено в условиях, описанных для удаления этой защиты с концевых фосфатов [23], обработкой конечной реакционной смеси, содержащей анилид (VI), изоамилнитритом в смеси пиридин — уксусная кислота (1 : 1). Через 18 ч реакция прошла количественно.

Экспериментальная часть

В работе использовали трифенилфосфин (Chemapol, СССР), силикагель (Мерск, ФРГ), анилин марки ч.д.а., четыреххлористый углерод, β -цианэтанол марки х. ч., перегнанные. Фенилтриэтанол предоставлен Яценцкой С. М. (СКТБ БАВ). TPS получен по методу [24], MST — по методу [16], (Tr)TrT(As) и (Tr)TrTrT(As), синтезированные, как описано в работах [25, 26], перед использованием высушивали азеотропной отгонкой с абсолютным пиридином.

Реакции проводили в пиридине, содержащем не более 0,03% воды, который хранили над молекулярными ситами типа 4А.

Электрофорез проводили на бумаге FN-16 в 0,02 М бикарбонате аммония (рН 7,5), используя аппарат для высоковольтного электрофореза ВЭФА-5-0,35. ТСХ осуществляли на силуфолу UV-254 (СССР) в системах растворителей: хлороформ — метанол, 9 : 1 (А); ацетонитрил — вода, 4 : 1 (Б); *n*-бутанол — вода, 84 : 16 (В); хлороформ — этанол, 9 : 1 (Г).

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в м. д. относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Количественную обработку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей по всему спектру.

Реакции, исследуемые методом ^{31}P -ЯМР, проводили в абсолютном пиридине непосредственно в ампуле.

Вещества идентифицировали по химическим сдвигам (δ), хроматографическим (R_f) и электрофоретическим (E_f) подвижностям, сравнивая эти величины с соответствующими характеристиками контрольных образцов или с литературными данными.

Взаимодействие (Tr)TrT(As) (II) с β -цианэтанолом в присутствии TPS. К раствору 0,2 ммоль (Tr)TrT(As) (II) в 2 мл пиридина добавляли 0,4 ммоль TPS и через определенные промежутки времени (28°) записывали спектры (рис. 1а). Затем к реакционной смеси добавляли 0,6 мл 1 М раствора β -цианэтанола в пиридине и через определенные промежутки времени записывали спектры (см. рис. 1б).

Взаимодействие (Tr)TrT(As) с β -цианэтанолом в присутствии MST. а) К 200 мг (0,2 ммоль) (Tr)TrT(As) (II) и 251,6 мг (1 ммоль) MST добавляли 0,3 мл пиридина и 1,4 мл 1 М раствора β -цианэтанола в пиридине. Реакцию проводили при 30° (рис. 2а).

б) 100 мг (0,1 ммоль) (Tr)TrT(As) растворяли в 0,8 мл пиридина и добавляли 125,5 мг (0,5 ммоль) MST и 0,7 мл 1 М раствора β -цианэтанола в пиридине. Реакцию проводили при 50° (рис. 2б).

Получение триазолида (Tr)TrT(As) (V). 100 мг (0,1 ммоль) (Tr)TrT(As) растворяли в 1,5 мл пиридина и добавляли 60,6 мг (0,2 ммоль) TPS. Через 15 мин записывали спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси: регистрировался один сигнал тетразамещенного пирофосфата (I) (δ 13,8 м. д.). Затем к реакционной смеси добавляли 69 мг (1 ммоль) триазола, предварительно высушенного трехкратным упариванием с абсолютным пиридином. Через 0,5 ч в спектрах ^{31}P -ЯМР реакционной смеси кроме сигналов исходного (Tr)TrT(As) и соединения (I) регистрировался сигнал триазолида (Tr)TrT(As) (V) с δ 10,5 м. д. При разложении реакционной смеси водой в спектрах ^{31}P -ЯМР регистрировался один сигнал исходного (Tr)TrT(As).

Взаимодействие (Tr)TrT(As) с фенилтиоэтанолом в присутствии MST. 100 мг (0,1 ммоль) (Tr)TrT(As) растворяли в 1,4 мл пиридина и добавляли 125,5 мг (0,5 ммоль) MST и 0,1 мл (0,7 ммоль) фенилтиоэтанола, предварительно высушенного многократным упариванием с пиридином. Реакцию проводили при 50° . Результаты приведены на рис. 3. К реакционной смеси через 10 ч добавляли 9,5 мл пиридина и 11 мл 1 н. охлажденной до 0° NaOH для удаления ацетильной защиты у триэфира (IV). Через 20 мин щелочь нейтрализовали катионитом дауэкс 50 W \times 4 в RuH^+ -форме, смолу отфильтровывали и промывали пиридином. Фильтрат упаривали в вакууме с этиловым спиртом. Остаток растворяли в 100 мл хлороформа и наносили на колонку с силикагелем (объем колонки 25 мл). Элюцию проводили 200 мл смеси хлороформ — метанол (9,5 : 0,5), контролируя элюирование вещества с помощью ТСХ в системах Б и В. Скорость элюции 0,6 мл/мин. Фракции собирали через 5 мин. Фракции 11—35 объединяли и упаривали. Выход фенилтиоэтилового эфира (Tr)TrT 65 мг, характеристики приведены в таблице.

Взаимодействие тринуклеозиддифосфата (Tr)TrTrT(As) с фенилтиоэтанолом в присутствии MST. 0,15 ммоль (Tr)TrTrT(As) растворяли в 0,8 мл пиридина. К раствору добавляли 188,3 мг (0,75 ммоль) MST и 0,14 мл (1 ммоль) фенилтиоэтанола. Реакцию проводили при 50° . Через определенные промежутки времени записывали спектры ^{31}P -ЯМР (рис. 4 и 5).

После удаления ацетильной защиты фосфотриэфир выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле. Для этого реакционную смесь упаривали со спиртом для удаления пиридина, остаток растворяли в 10 мл хлороформа и наносили на колонку с силикагелем (объем колонки 20 мл). Элюцию проводили 150 мл смеси хлороформ — метанол (9,5 : 0,5), контролируя элюирование веществ с помощью ТСХ в системе А. Скорость элюции 0,2 мл/мин. Фракции собирали через 5 мин. Фракции 39—60, содержавшие фенилтиоэтиловый эфир (Tr)TrT, объединяли и упаривали в вакууме. Характеристики выделенного продукта приведены в таблице.

Взаимодействие (Tr)TrT(Ac) с анилином в присутствии системы трифенилфосфин — четыреххлористый углерод. К 100 мг (0,1 ммоль) (Tr)TrT(Ac) добавляли 182 мг (0,7 ммоль) трифенилфосфина и смесь высушивали с абсолютным пиридином. В сухой камере (Tr)TrT(Ac) и трифенилфосфин растворяли в 1,3 мл пиридина. Затем к раствору добавляли 0,07 мл (0,7 ммоль) CCl_4 и 0,1 мл анилина и через определенные промежутки времени записывали спектры ^{31}P -ЯМР (рис. 6 и 7). Для выяснения устойчивости фосфамидной связи в условиях удаления ацетильной защиты с 3'-оксигруппы из аликовты реакционной смеси выделяли аниlid (VI) с помощью ТСХ в системе А с последующей элюцией этанолом и упариванием. Затем остаток растворяли в 3 мл пиридина и добавляли 3 мл охлажденной 2 н. NaOH. Через 20 мин щелочь нейтрализовали катионитом дауэкс 50 W \times 4 в RuH^+ -форме. Смолу отфильтровывали и промывали пиридином. По данным ТСХ и электрофореза, анилидная защита устойчива в условиях удаления ацетильной защиты и полученное вещество представляет собой аниlid (Tr)TrT (см. таблицу).

Удаление β -цианэтильной защиты. К раствору 0,05 ммоль цианэтилового эфира (III) в 0,7 мл пиридина добавляли 1 мл смеси конц. аммиак — метанол (1 : 1), реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20°, а затем упаривали со спиртом для удаления из реакционной смеси пиридина. По данным ТСХ в системе А, единственным продуктом нуклеотидной природы является (Tr)TrT.

Удаление анилидной защиты. К реакционной смеси, содержащей 0,01 ммоль анилида (Tr)TrT(Ac) в 0,2 мл пиридина, добавляли 0,8 мл пиридина, 1 мл уксусной кислоты и 0,1 мл изоамилнитрита. Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 20°, после чего упаривали со спиртом для удаления из реакционной смеси пиридина. По данным ТСХ в системе А, единственным продуктом нуклеотидной природы является (Tr)TrT(Ac).

Удаление фенилтиоэтильной защиты у триэфира (IV) проводили по методу [20]. Судя по ТСХ в системе А, единственным продуктом нуклеотидной природы является (Tr)TrT.

Авторы выражают глубокую благодарность А. В. Лебедеву и Л. М. Халимской за помощь в выполнении работы и Д. Г. Кнорре за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Лебедев А. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 1211—1218.
2. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Rezvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) Tetrahedron, 33, 3073—3079.
3. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 126—132.
4. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1401—1418.
5. Knorre D. G., Zarytova V. F. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 2709—2729.
6. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 121—126.
7. Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Шубина Т. Н. (1976) Биоорган. химия, 2, 1189—1195.
8. Smrt S. (1972) Collect. Czech. Chem. Commun., 37, 846—861.
9. Zielinski W. S., Smrt J. (1974) Collect. Czech. Chem. Commun., 39, 2483—2490.

10. Быстров П. С., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Чернов Б. К. (1976) Биоорг. химия, 2, 1271—1272.
11. Сергеева Н. Ф., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1977) Докл. АН СССР, 88, 607—609.
12. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. (1976) Биоорг. химия, 2, 1196—1203.
13. Лебедев А. В., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 2, 149—154.
14. Crutchfield M. M., Dungan C. H., Letcher J. H., Crutchfield M. M., Dungan C. H., Letcher J. H., Mark V., Van Wazer J. R. (1967) Topics in phosphorous chemistry, vol. 5, Interscience Press, New York—London—Sydney.
15. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332—7337.
16. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1974) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 325—326.
17. Сергеева Н. Ф., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., Зарытова В. Ф., Лебедев А. В., Кнорре Д. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 1056—1061.
18. Wightman R. H., Narang S. A., Itakura K. (1972) Can. J. Chem., 50, 456—457.
19. Narang S. A., Bhanot O. S., Goodchild J., Wightman R. H., Dheer S. K. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 6183—6189.
20. Smrt J. (1974) Collect. Czech. Chem. Commun., 39, 972—981.
21. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Семенова Л. И., Шубина Т. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 735—739.
22. Appel R. (1975) Angew. Chem. internat. Edit., 14, 801—811.
23. Ohtsuka E., Muraio K., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3441—3446.
24. Lohrmann R., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 829—833.
25. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6222.
26. Gilham P. T., Khorana H. G. (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 4647—4650.

Поступила в редакцию
29.VII.1977
После переработки
25.I.1978

**INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF OLIGONUCLEOTIDE CHEMICAL
SYNTHESIS. XII. INTERACTION OF OLIGONUCLEOTIDE
PHOSPHODIESTER GROUPS WITH ALCOHOLS AND AMINES
IN THE PRESENCE OF CONDENSING REAGENTS AS REVEALED BY ³¹P-NMR**

ZARYTOVA V. F., SHESHEGOVA E. A.

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

Blocking of phosphodiester (PDE) groups of oligonucleotides was investigated by the pulsed ³¹P-NMR spectroscopy. It is shown that interaction of (Tr)TpT(Ac) with β-cyanoethanol or aniline in the presence of TPS or triphenyl phosphine-CCl₄ pair, respectively, proceeds via the intermediate formation of P¹,P²-bis-5'-O-tritylthymidine-bis-3'-O-acetylthymidine-5'-pyrophosphate which further converts into (Tr)TpT(Ac) β-cyanoethyl ester or anilide. It is found that the (Tr)TpT(Ac) interaction with β-cyanoethanol or phenylthioethanol in the presence of MST proceeds via two routes: namely, forming tetrasubstituted pyrophosphate or triazolide (Tr)TpT(Ac), the first route being preferential. Blocking PDE groups of trinucleoside diphosphate (Tr)TpTpT(Ac) with phenylthioethanol in the presence of MST occurs mainly via the intermediate formation of the compounds containing tetrasubstituted pyrophosphate groups, including also intramolecular cyclic pyrophosphates.