

УДК 547.963.3

**МЕТОДЫ СТУПЕНЧАТОГО СИНТЕЗА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ  
 $C_3'$ — $C_5'$ -МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ**

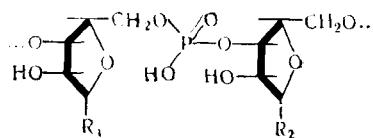
*C. M. Женодарова*

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	82
II. Способы специфической защиты функциональных групп в нуклеозидах и нуклеотидах	83
1. Защита гидроксильных групп в дезоксирибонуклеозидах и дезоксирибонуклеотидах	83
2. Получение рибонуклеозидов со свободной гидроксильной группой в положении $C_5'$	83
3. Получение рибонуклеозидов со свободной гидроксильной группой в положении $C_3'$	85
4. Защита гидроксильных групп в рибонуклеотидах	86
5. Защита аминных групп пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеозидах и нуклеотидах	90
III. Способы образования $C_3'$ — $C_5'$ -межнуклеотидной связи	92
1. Синтез динуклеозидфосфатов с неспецифической межнуклеотидной связью	92
2. Карабодимидный метод синтеза $C_3'$ — $C_5'$ -связи	92
3. Применение других реагентов для синтеза специфической $C_3'$ — $C_5'$ -межнуклеотидной связи	95
4. Синтез олигонуклеотидов с $C_3'$ — $C_5'$ -связью	97
IV. Способы получения олигонуклеотидов со свободной фосфомоноэфирной группой	98

**I. ВВЕДЕНИЕ**

Значительные успехи в выяснении роли нуклеиновых кислот в биосинтезе белка<sup>1</sup> привлекают все большее внимание к синтетическим полинуклеотидам, которые служат моделями при изучении химических, биохимических и биологических свойств нуклеиновых кислот. Особый интерес проявляется к способам получения нуклеотидов с известной последовательностью нуклеотидных остатков в полинуклеотидной цепи. Один из таких способов — ступенчатый синтез специфической межнуклеотидной связи, представляющей собой фосфодиэфирную связь, в которой остаток фосфорной кислоты связан с  $C_3'$ -атомом\* одного нуклеозида и с  $C_5'$ -атомом второго<sup>2</sup>:



При разработке методов синтеза специфической  $C_3'$ — $C_5'$ -межнуклеотидной связи необходимо решить две основных задачи: 1) найти пути защиты тех функциональных групп, которые присутствуют в молекулах нуклеозидов и нуклеотидов (гидроксильных групп сахара и аминных

\* Нумерация атомов в остатках нуклеиновых оснований и сахаров, входящих в состав нуклеиновых кислот, дана по<sup>3</sup>.

групп пуриновых и пиримидиновых оснований), получая производные нуклеозидов и нуклеотидов только с одной реакционноспособной группой; 2) осуществить конденсацию полученных производных таким образом, чтобы образовывалась только  $C_3'$ — $C_5'$ -фосфодиэфирная связь. И в том, и в другом случае следует учитывать недостаточную стабильность образующейся  $C_3'$ — $C_5'$ -связи, которая гидролизуется кислотами<sup>4</sup> и щелочами<sup>5</sup> и изомеризуется в  $C_2'$ — $C_5'$ -связь в кислой среде<sup>6,7</sup>. Все это ограничивает выбор защитных групп, так как для последующего полного или избирательного их удаления часто требуются довольно жесткие условия.

## II. СПОСОБЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП В НУКЛЕОЗИДАХ И НУКЛЕОТИДАХ

Схема синтеза  $C_3'$ — $C_5'$ -связи может быть представлена двумя вариантами: 1) нуклеозид-3'-фосфат конденсируют с нуклеозидом, имеющим свободную гидроксильную группу в положении  $C_5'$  (5'-ОН); 2) нуклеозид-5'-фосфат конденсируют с нуклеозидом, имеющим свободную гидроксильную группу в положении  $C_3'$  (3'-ОН). Таким образом, для синтеза  $C_3'$ — $C_5'$ -межнуклеотидной связи необходимо иметь нуклеозиды со свободными 3'-ОН или 5'-ОН-группами (нуклеозидный компонент) и нуклеотиды с остатком фосфорной кислоты в положении  $C_3'$  или  $C_5'$  при полностью защищенных остальных функциональных группах (нуклеотидный компонент).

### 1. Защита гидроксильных групп в дезоксирибонуклеозидах и дезоксирибонуклеотидах

Получение соответствующим образом защищенных дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов не представляет больших трудностей, так как гидроксильная группа в положении  $C_2'$  отсутствует, а 3'-ОН и 5'-ОН-группы, как известно, различаются по своей реакционной способности. На этом различии основано применение трифенилметилхлорида (тритилхлорида) для защиты 5'-ОН-группы: тритилхлорид значительно быстрее реагирует с первичным гидроксилом<sup>8-12</sup>. Кроме тритильной группы, которую наиболее часто использовали для защиты 5'-ОН в дезоксирибонуклеозидах<sup>13</sup> и дезоксирибонуклеотидах<sup>14</sup>, для этой же цели вводят ацетильную группу<sup>15</sup> и ди-*p*-анизилфенилметильную (ди-*p*-АФМ)-группу<sup>16,17</sup>. Ацетильная группа применялась также для защиты 3'-ОН в дезоксирибонуклеозидах<sup>14</sup> и дезоксирибонуклеотидах<sup>18</sup>, причем смеси 3'-О-ацетил- и 5'-О-ацетилпроизводных, получающиеся в первом случае, разделялись при помощи противоточного разделения<sup>19</sup>.

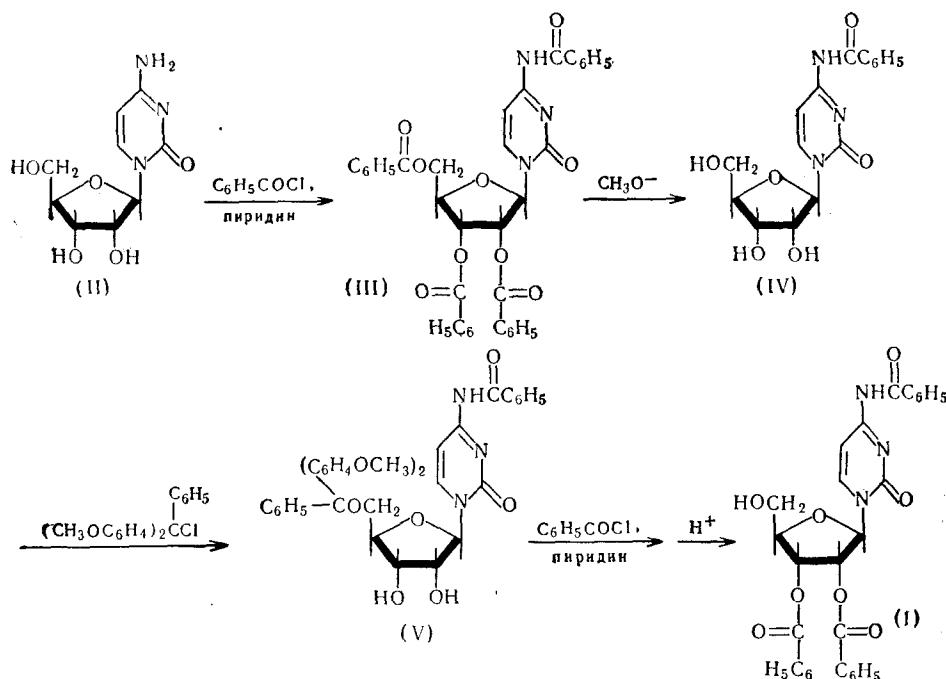
Значительно труднее получение соответствующим образом защищенных производных рибонуклеозидов и рибонуклеотидов, так как гидроксильные группы в положении  $C_2'$  и  $C_3'$  не различаются по своим свойствам.

### 2. Получение рибонуклеозидов со свободной гидроксильной группой в положении $C_5'$

Рибонуклеозиды со свободной 5'-ОН можно получить, используя *цис*-гликольную группировку в остатке рибозы, способную к образованию ацеталей: 2',3'-О-изопропилиден-<sup>20,21</sup>, -анизилиден<sup>22</sup>, -цикlopентилиден-<sup>22</sup>, -циклогексилиден-<sup>22</sup> или -бензилиденрибонуклеозидов<sup>22,23</sup>. Однако применение этих производных рибонуклеозидов для синтеза олиго-

нуклеотидов ограничено, так как для последующего расщепления ацетильных связей нужны довольно жесткие условия. По этой же причине оказалась мало подходящей и более лабильная *p*-метоксибензилидено-вая группа<sup>7</sup>. Также не стал препаративным предложенный Тоддом и сотрудниками<sup>24</sup> способ получения 2',3'-ди-*O*-ацетилуридина частичным дезацетилированием 2',3',5'-три-*O*-ацетилуридина с последующим разделением смеси моно-, ди- и триацетилуридинов методом противоточного распределения.

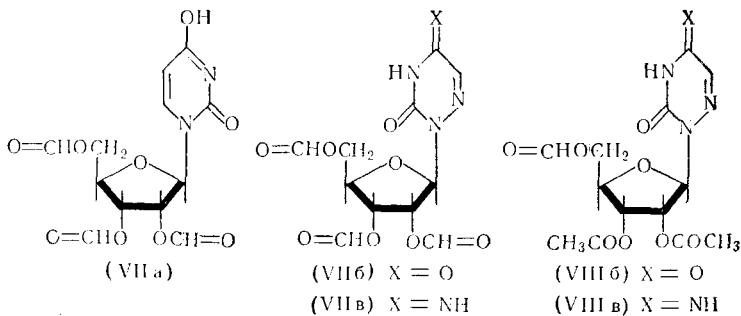
Обычно рибонуклеозиды со свободной 5'-ОН-группой получают через 5'-О-тритилпроизводные: 2',3'-ди-*O*-бензоилуридин был получен из 5'-ОН-тритилуродина<sup>25</sup> или из 5'-ОН-ди-*p*-АФМ-уридина<sup>26</sup>. N<sup>6</sup>,O<sup>2'</sup>,O<sup>3'</sup>-трибензоилцитидин (I) можно получить взаимодействием цитидина (II) с бензоилхлоридом в пиридине, причем получают полностью бензоилированный цитидин (III)<sup>27</sup>, осторожная обработка которого метоксидом натрия дает кристаллический N<sup>6</sup>-бензоилцитидин (IV) с хорошим выходом. Затем защищают 5'-ОН в **IV** ди-*p*-АФМ-группой и вновь бензоилируют 2'-ОН и 3'-ОН в полученном N<sup>6</sup>-бензоил-5'-ОН-ди-*p*-АФМ-цитидине (V). Отщепление ди-*p*-АФМ-группы в кислой среде приводит к **I**:



Более простой путь через 5'-ОН-ди-*p*-АФМ-цитидин (**VI**) с бензоилированием **VI** и последующим отщеплением ди-*p*-АФМ-группы неприемлем, так как при получении **VI** одновременно образуется некоторое количество моно-N<sup>6</sup>-ди-*p*-АФМ-цитидина<sup>28</sup>.

Шорм и сотрудники<sup>28</sup> предложили использовать для получения специфически защищенных рибонуклеозидов их О-формильные производные, синтез которых можно осуществить обычными методами формилирования<sup>29-31</sup>. Отщепление О-формильных групп происходит уже при нагревании в метаноле, т. е. в условиях, при которых другие защитные группы, например ацетильная, устойчивы. Изучение метанолиза 2',3',5'-три-*O*-формилпроизводных уридина (**VIIa**), 6-азауридина (**VIIb**) и

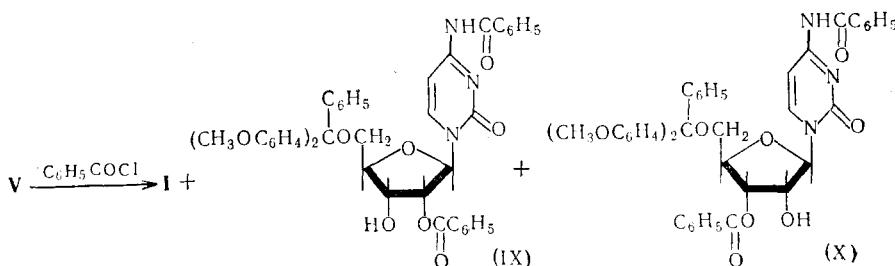
6-азацитидина (VIIв) показало, что формильные группы в положениях  $C_2'$  и  $C_3'$  гидролизуются быстрее, чем та же группа в положении  $C_5$ . Различие в скорости метанолиза практически не зависит от структуры гетероциклического основания, хотя последняя влияет на скорость метанолиза формильной группы в положении  $C_5$ : 5'-О-формилуридин гидролизуется до уридина за 1 час, 5'-О-формилазуридин — за 16 часов.



Из VIIIа, б, в были получены соответствующие 5'-О-формилпроизводные. Попытка селективно отщепить О-формильную группу в присутствии О-ацетильной не дала положительного результата: 2',3'-О-диацетил-5'-О-формилазуридин (VIIIб) и -азацитидин (VIIIв) при нагревании с метанолом превратились в VIIIб и VIIIв.

### 3. Получение рибонуклеозидов со свободной гидроксильной группой в положении $C_{3'}$

Многочисленные попытки получить рибонуклеозиды со свободной 3'-ОН-группой оказались безуспешными<sup>26</sup>. Частичное бензоилирование **V** небольшим избытком бензоилхлорида дает смесь **I** и двух моно-О-бензоилированных веществ, вероятно,  $N^6, O^{2'}\text{-дibenzoil-O}^{5'}\text{-di-}p\text{-AFM-цитидина}$  (**IX**) и  $N^6, O^{3'}\text{-дibenzoil-O}^{5'}\text{-di-}p\text{-AFM-цитидина}$  (**X**), разделить которую не удалось. Частичное дебензоилирование **III** приводит к смеси  $N^6O^{5'}\text{-дibenzoilцитидина}$  (**XI**) и  $N^6, O^{3'}, O^{5'}\text{-трибензоилцитидина}$  (**XII**), разделяющейся на колонке с кремневой кислотой. Обработка **XI** бензоилхлоридом (несколько более одного молярного эквивалента) дает оба ожидаемых изомера: **XII** и  $N^6, O^{2'}, O^{5'}\text{-трибензоилцитидин}$  (**XIII**).



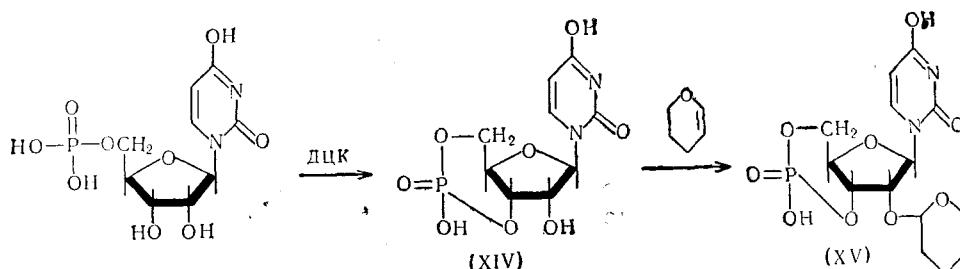
Фосфорилирование **XII** и **XIII** показало, что ацильная группа мигрирует частично от 2'-ОН к 3'-ОН, что согласуется с ранее полученными данными<sup>32-34</sup>. Предполагают, что эту миграцию могут катализировать кислота<sup>35</sup> или основание, причем в щелочной среде, вероятно, происходит быстрая миграция от 2'-ОН к 3'-ОН<sup>5</sup>. Принимая все это во внимание, можно считать, что непосредственное использование производных рибонуклеозидов, имеющих свободную 3'-ОН и ацильную группу в положении C<sub>2'</sub>, практически невозможно.

#### 4. Защита гидроксильных групп в рибонуклеотидах

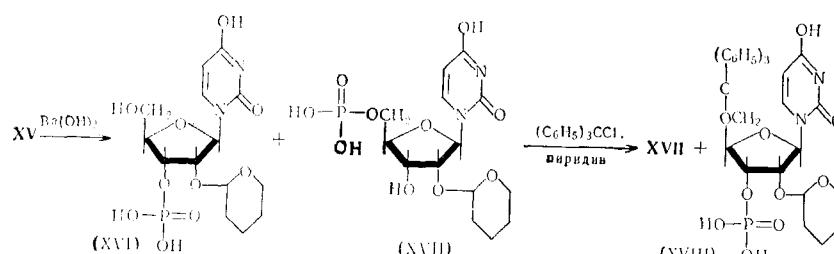
Как уже отмечалось, для синтеза олигонуклеотидов со специфической  $C_3'$ — $C_5'$ -связью рибонуклеотиды должны быть превращены в полностью защищенные производные так, чтобы реакционноспособным был только остаток фосфорной кислоты, а защитные группы у 5'-ОН и 2'-ОН или у 3'-ОН и 2'-ОН можно было удалять независимо друг от друга.

Как и в случае дезоксирибонуклеотидов, для защиты 5'-ОН-группы был предложен тритилхлорид<sup>36</sup>. Чтобы защитить 2'-ОН-группы в мононуклеотидах, пытались получать 2'-О-бензиловые эфиры нуклеозид-3',5'-циклофосфатов, используя хлористый бензил и *трет*.-бутилат калия<sup>36, 37</sup>. Однако в монобензилированном производном бензильная группа мигрирует в пиридиновое кольцо. Расхождение полученных результатов с данными Тодда и сотрудников<sup>38</sup>, синтезировавших О-бензиловые эфиры нуклеозидов, авторы объясняют различными условиями реакции.

Более удачным для защиты 2'-ОН-группы оказался следующий способ<sup>7, 36</sup>: уридин-5'-фосфат в сильно разбавленном растворе в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) превращается в уридин-3',5'-циклофосфат (XIV), который при взаимодействии с дигидропираном в безводном диоксане при  $\sim 20^\circ$  количественно переходит в 2'-О-тетрагидропирианильное (2'-О-ТГП)-производное (XV):



Гидролиз **XV** гидроокисью бария дает смесь 2'-О-ТГП-уридин-3'-фосфата (XVI) и 2'-О-ТГП-уридин-5'-фосфата (XVII) в отношении 5:1, разделить которую не удалось. Обработка смеси тритилюхоридом в пиридине приводит к количественному образованию 2'-О-ТГП-5'-О-тритиль-уридин-3'-фосфата (XVIII), легко отделяющегося от неучаствующего в реакции **XVII** при помощи распределительной или ионообменной хроматографии:

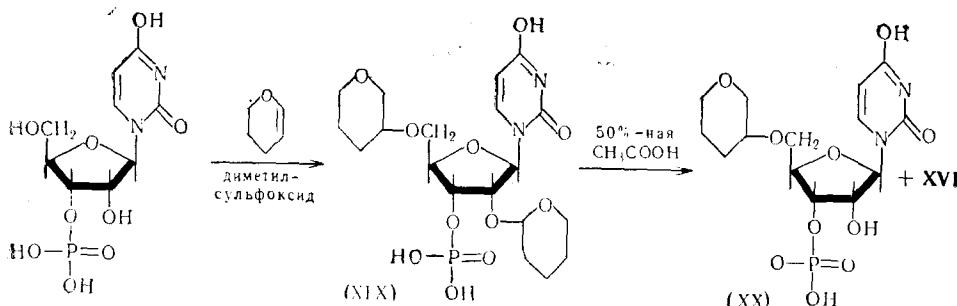


Для цитидин-5'-фосфата этот путь оказался неудовлетворительным, так как при раскрытии фосфатного кольца щелочью происходит интенсивное дезаминирование цитозинового кольца<sup>39</sup>.

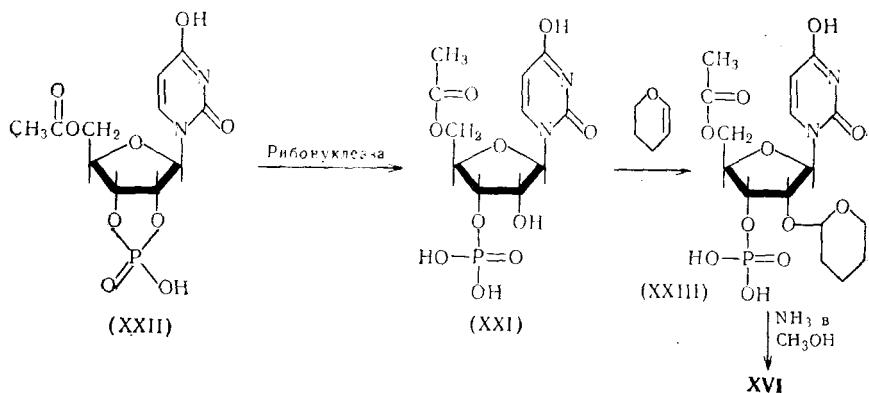
И тритильная, и ТГП-группы удаляются при обработке соответствующего производного водной уксусной кислотой, причем ТГП-группа гидролизуется быстрее тритильной<sup>7</sup>. Так как для ступенчатого синтеза C<sub>3'</sub>—C<sub>5'</sub>-связи необходимо селективно удалять 5'-O-тритильную группу, была сделана попытка использовать для этой цели каталитическое гидрирование, однако такой способ в ряде случаев не дал хороших результатов<sup>40, 41</sup>. В частности, оказалось, что при этом может гидрироваться цитозиновое кольцо<sup>42</sup>.

Принимая во внимание, что легкость ионизации *p*-метоксизамещенных трифенилкарбинолов сильно повышается с введением каждой *p*-метокси-группы<sup>43</sup>, Корана и сотрудники<sup>7</sup> предложили использовать для защиты 5'-ОН модифицированную тритильную группу. Изучение гидролитической устойчивости 5'-O-*p*-анизилдифенилметилуридина, 5'-O-ди-*p*-АФМ-уридина и 5'-O-три-*p*-анизилметилуридина показало, что введение каждой *p*-метокси-группы повышает скорость гидролиза в 80%-ной уксусной кислоте при 20° ~ в 10 раз. Введение *p*-метокси-групп в тритилюрид хлорид повышает также скорость взаимодействия его с гидроксидом, в том числе с вторичными гидроксильными группами, что может создавать неудобства при получении производных нуклеотидов. Оказалось целесообразным применять для защиты 5'-ОН-ди-*p*-АФМ-хлорид, поскольку разница в скоростях отщепления 2'-O-ТГП- и 5'-O-*p*-анизилдифенилметильной групп еще недостаточна для селективного удаления последней, в то время как при обработке 2'-O-ТГП-5'-O-ди-*p*-АФМ-уридин-3'-фосфата 80%-ной уксусной кислотой при 0° в течение 6 часов с хорошим выходом получается **XVI**.

Прямое блокирование 2'-ОН-группы впервые попытался провести Тодд<sup>44</sup>, обрабатывая д-уридиловую кислоту иодистым метилом в присутствии Ag<sub>2</sub>O. При этом была получена смесь производных 2'- и 3'-фосфата. Можно получать защищенные рибонуклеозид-3'-фосфаты, непосредственно вводя последние в реакцию с дигидропираном в диметилсульфоксиде в присутствии трифторуксусной кислоты<sup>26</sup>. Для уридин-3'-фосфата реакция идет с почти количественным выходом, причем тетрагидропирианилирование 2'-ОН-группы происходит быстрее, чем миграция остатка фосфорной кислоты. Аденозин-3'-фосфат в тех же условиях образует 70% 2',5'-ди-О-ТГП-аденозин-3'-фосфата и немного N,O<sup>2</sup>,O<sup>5</sup>-три-ТГП-аденозин-3'-фосфата, количество которого растет с увеличением времени тетрагидропирианилирования. Установлено, что скорость гидролиза ТГП-групп в положениях C<sub>2'</sub> и C<sub>5'</sub> неодинакова<sup>45, 46</sup>: обработка 2',5'-ди-О-ТГП-уридин-3'-фосфата (XIX) 50%-ной уксусной кислотой при 0° в течение 3 часов дает смесь **XVI** и 5'-O-ТГП-уридин-3'-фосфата (XX), причем последний преобладает (75%). Смесь можно разделить, обрабатывая ее ди-*p*-АФМ-хлоридом и пропуская через колонку с ДЕАЕ-целлюлозой:



Шорм и сотрудники<sup>47, 48</sup> предложили проводить тетрагидропирианирование 2'-ОН-группы, предварительно ацетилировав 5'-ОН-группу в рибонуклеозид-3'-фосфате, что позволяет затем избирательно удалять защитные группы благодаря тому, что ацетильный остаток легко отщепляется в щелочной среде, в которой ТГП-группа остается незатронутой. 5'-О-ацетилуридин-3'-фосфат (XXI) в виде кальциевой соли получали из 5'-О-ацетилуридин-2',3'-циклофосфата (XXII), расщепляя его панкреатической рибонуклеазой. Тетрагидропирианирование можно проводить, используя кальциевую соль и прибавляя 1 экв. соляной кислоты для образования гомогенного раствора. Необходимо также прибавлять небольшой избыток соляной кислоты для того, чтобы катализировать реакцию, которая в этих условиях проходит количественно при комнатной температуре за 40—50 часов. Миграции остатка фосфорной кислоты не происходит. Реакция, приводящая к образованию 5'-О-ацетил-2'-О-ТГП-уридин-3'-фосфата (XXIII), протекает значительно быстрее (за 8 часов), если проводить ее с аммониевой или пиридиниевой солью 5'-О-ацетилнуклеозид-3'-фосфата в смеси диметилсульфоксида и диметилформамида, добавляя 2 моль соляной кислоты на 1 моль соли фосфата<sup>49</sup>. Ацетильная группа отщепляется смесью метанола и аммиака при 50° (при 20° выход деацетилированного продукта ниже):

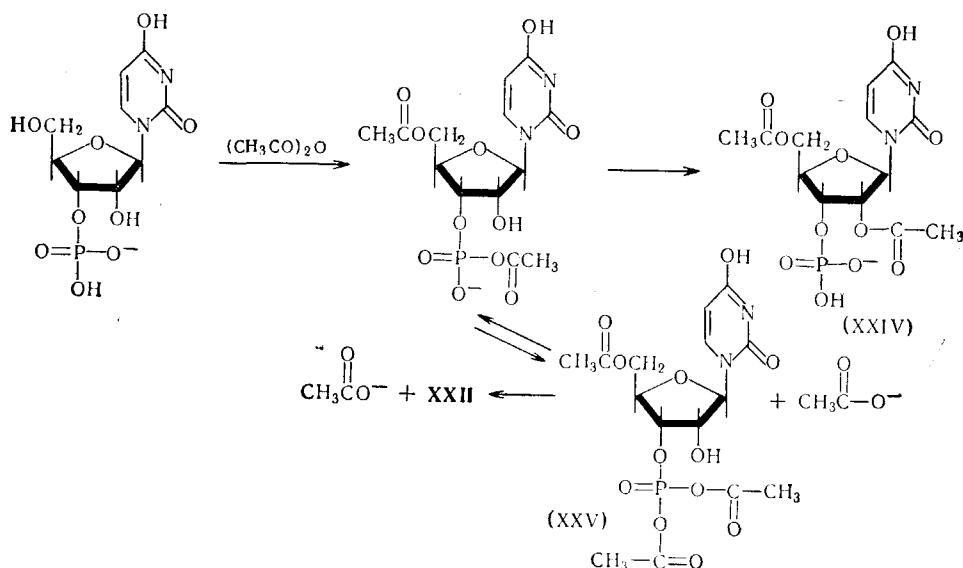


ТГП-группу можно удалять не только водным раствором уксусной кислоты, но и при помощи сильнокислых ионообменных смол, например, Дауэкс 50 в пиридиниевой или аммониевой форме. Скорость отщепления зависит от степени «сшивки» смолы и концентрации пиридина в растворе: ТГП-группа легко удаляется, если «сшивка» мала, скорость отщепления понижается с увеличением концентрации пиридина. Наиболее благоприятные условия для отщепления создаются при использовании Дауэкс 50×8 в 30%-ном пиридине.

Использование ТГП- и ди-*p*-АФМ-производных нуклеотидов для синтеза динуклеозидфосфатов показало, что недостатком этих защитных групп является неполное удаление их при непродолжительной обработке кислотой<sup>7</sup>, а увеличение времени обработки ведет к частичной изомеризации C<sub>3</sub>-—C<sub>5</sub>-связи. Так, при обработке 2'-О-ТГП-5'-О-ди-*p*-АФМ-уридилил-(3'-5')-уридина 80%-ной уксусной кислотой в течение 4 часов получают 50% уридилил-(3'-5')-уридина. 10-часовая обработка повышает выход до 69%, но вещество содержит ~1% уридилил-(2'-5')-уридина. Аналогичные результаты синтеза уридилил-(3'-5')-аденозина: 4-часовая обработка 80%-ной уксусной кислотой 2'-О-ТГП-5'-О-ди-

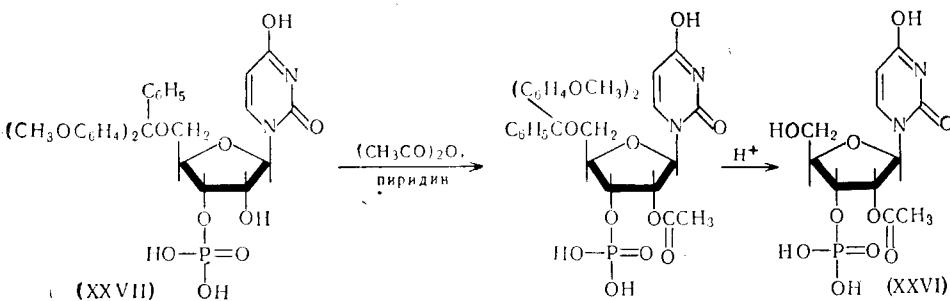
*p*-АФМ-уридилил-(3'-5')-аденозина давала 54,5% чистого уридилил-(3'-5')-аденозина, тогда как через 11 часов выход повышался до 70%, но вещество содержало ~1,5% уридилил-(2'-5')-аденозина. Низкий выход (28—40%) при синтезе уридилил-(3'-5')-уридина, уридилил-(3'-5')-цитидина и уридилил-(3'-5')-аденозина из **XIX** и соответствующих производных уридина, цитидина и аденоцина<sup>26</sup> также связан с неполным удалением защитных групп, особенно 5'-О-ТГП-группы.

Корана и сотрудники<sup>45</sup> предложили заменить эти группы ацетильной. В противоположность данным Шорма и сотрудников<sup>48</sup>, сообщившим о том, что ацетилирование нуклеозид-3'-фосфатов всегда приводит к образованию 2',3'-циклофосфатов, было найдено, что в зависимости от условий реакции уксусного ангидрида с рибонуклеозид-3'-фосфатом может протекать по-разному: в кислой среде уридин-3'-фосфат образует преимущественно 2',3'-циклофосфат, в щелочной среде (пиридин) избыток уксусного ангидрида приводит к образованию смеси **XXII** и 2',5'-О-диацетилуридин-3'-фосфата (**XXIV**), причём последний содержится в смеси в количестве 35%. Если уксусный ангидрид заменить бромистым ацетилом, получается 51% **XXIV**. Ацетилирование других рибонуклеозид-3'-фосфатов протекает аналогично. Принимая во внимание, что приключение воды в смеси пиридин — уксусный ангидрид понижает образование циклофосфата и предполагая, что роль воды сводится к образованию ацетатных ионов, Корана и сотрудники<sup>45, 46, 50</sup> предложили проводить ацетилирование в безводной среде, используя в качестве источника ацетатных ионов ацетат тетраэтиламмония. **XXIV** был получен с 92%-ным выходом из пиридиниевой соли уридин-3'-фосфата в сухом пиридине с избытком (30-кратным) уксусного ангидрида при ~20° в течение 1 часа. Считают, что **XXII** образуется через промежуточный диацилфосфат (**XXV**), и ацетатные ионы, вероятно, ингибируют его образование:



Ацетильная группа использована также для защиты 2'-ОН при предварительном блокировании 5'-ОН в рибонуклеозид-3'-фосфате группой, которая устойчива в щелочной и отщепляется в кислой среде<sup>46</sup>. Так,

2'-О-ацетилуридин-3'-фосфат (XXVI) был получен из **XX** и 5'-О-ди-*p*-АФМ-уридин-3'-фосфата (XXVII) путем обработки их избытком уксусного ангидрида в пиридине с последующим отщеплением защитной группы в C<sub>5'</sub>-положении: ТГП-группа удаляется при pH 2,8 в присутствии смолы Дауэкс 50 при комнатной температуре за 7,5 часов, ди-*p*-АФМ-группа — при pH 2,5 за 7 минут. В обоих случаях в качестве главного продукта получили **XXVI**.



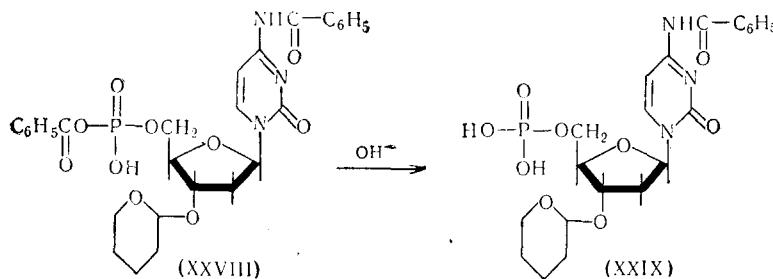
### 5. Защита аминных групп пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеозидах и нуклеотидах

Амино-группы пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеозидах и нуклеотидах весьма реакционноспособны<sup>42, 51-53</sup>. Так, при конденсации 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата с 5'-О-тритилдезоксицитидином в присутствии ДЦК главной реакцией было фосфорилирование амино-группы дезоксицитидина активированным нуклеотидным компонентом<sup>52</sup>. Поэтому для синтеза олигонуклеотидов с C<sub>3'</sub>—C<sub>5'</sub>-связью необходимо блокировать, наряду с окси-группами, аминные группы нуклеозидных и нуклеотидных компонентов. Для этой цели обычно используют ацетильную<sup>15, 42, 54</sup>, бензоильную<sup>17, 52, 55</sup> и анильную<sup>52, 55</sup> группы.

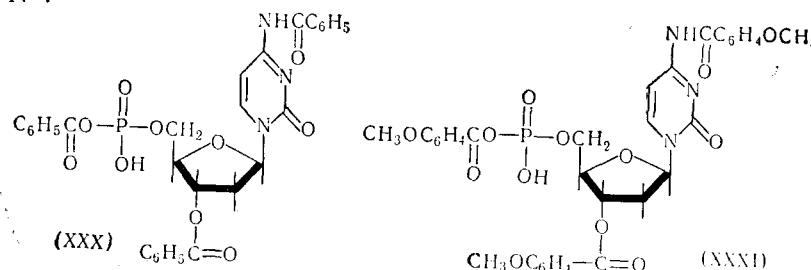
N-ацетильные производные нуклеозидов и нуклеотидов получают из N, O-ацетильных производных, используя различную скорость гидролиза O-ацетильных и N-ацетильных групп<sup>41, 42</sup>; в щелочной среде O-ацетильные группы отщепляются быстрее N-ацетильных. Несмотря на это, не удалось селективно удалить 3'-O-ацетильную группу из N<sup>6</sup>,O<sup>3'</sup>-диацетилдезоксицитидин-5'-фосфата<sup>42</sup>. Способ селективного ацетилирования амино-группы в цитидин-2',3'-циклофосфате ограниченным количеством ацетилирующего агента<sup>54</sup> оказался непригодным для получения N<sup>6</sup>-ацетилдезоксицитидин-5'-фосфата, так как уксусный (или другой) ангидрид реагирует с мононуклеотидом, образуя преимущественно смешанный ацилфосфат типа ангидрида<sup>56</sup>. Недостатком N-ацетильной защиты является ее неустойчивость в кислой среде<sup>7, 52, 57</sup>: частичное отщепление N-ацетильной группы было отмечено при непродолжительной обработке разбавленной уксусной кислотой N<sup>6</sup>-ацетил-O<sup>3'</sup>-ТГП-дезоксицитидин-5'-фосфата<sup>52</sup>, N, O<sup>2',3'</sup>-триацетил-O<sup>5'</sup>-тритиладенозина<sup>57</sup> и N-ацетил-O<sup>5'</sup>-три-*p*-анизилметиладенозина<sup>7</sup>. Кроме того, N-ацетильные производные нуклеозидов и нуклеотидов недостаточно хорошо растворимы в пиридине.

N-бензоильные производные<sup>26, 52, 55</sup> устойчивее к кислотам и более растворимы. При продолжительном взаимодействии 3'-O-ТГП-дезоксицитидин-5'-фосфата с бензойным ангидридом в пиридине образуется, ве-

роятно, соединение типа **XXVIII**, ангидридная связь в котором очень устойчива к водному пиридину<sup>58</sup>. N<sub>6</sub>-бензоил-3'-O-ТГП-дезоксицитидин-5'-фосфат (**XXIX**) получается с высоким выходом после кратковременной обработки **XXVIII** щелочью и очистки на ДЕАЕ-целлюлозе:



N<sup>6</sup>-бензоилдезоксицитидин-5'-фосфат получен бензоилированием дезоксицитидин-5'-фосфата избытком бензойного ангидрида или бензоилхлорида в пиридине с последующей обработкой получающегося производного (**XXX**) смесью пиридина и водного раствора NaOH в тщательно контролируемых условиях<sup>52</sup>. Аналогично получен N-бензоилдезоксиаденозин-5'-фосфат<sup>55</sup>. N-бензоильная группа в последнем более стабильна, чем в соответствующем производном дезоксицитидин-5'-фосфата. N<sup>6</sup>-бензоилцитидин получается частичным дебензоилированием N<sup>6</sup>, O<sup>2'</sup>, O<sup>3'</sup>, O<sup>5'</sup>-тетрабензоилцитидина метилатом натрия<sup>26</sup>. Бензоилирование аденоцина в мягких условиях избытком бензоилхлорида дает кристаллическое пентабензоильное производное<sup>7</sup>. При высокой температуре в адениновое кольцо могут войти две бензоильные группы<sup>59,60</sup>. Предполагают<sup>7</sup>, что одна из них локализована у N<sup>6</sup>, вторая, возможно, находится у N<sup>2</sup>.



Очень устойчивы к щелочи N-анизильные производные нуклеозидов и нуклеотидов: при щелочной обработке полностью замещенного производного дезоксицитидин-5'-фосфата (**XXXI**) получают с 90%-ным выходом N<sup>6</sup>-анизилдезоксицитидин-5'-фосфат, причем дезоксицитидин-5'-фосфат в продуктах реакции не обнаружен<sup>52</sup>. Изучение скорости гидролиза различных N-ацилдезоксицитидин-5'-фосфатов в 9 N NH<sub>4</sub>OH и NaOH при комнатной температуре показало, что аммиак более эффективен для гидролиза и что по устойчивости N-ацильные остатки располагаются в порядке: N-анизил > N-бензоил > N-ацетил. При продолжительном взаимодействии N-анизил- и N-бензоилдезоксицитидин-5'-фосфата со щелочью, а также с водной уксусной кислотой наблюдается некоторое дезаминирование<sup>52</sup>, еще более интенсивное у N<sup>6</sup>-ацилцитозинов<sup>27</sup>. Аммиак дезаминирования не вызывает. При применении уксусной кислоты степень дезаминирования меняется в зависимости от природы N-ацильной группы: — N-ацетильная легче дезаминируется, чем N-бензоильная.

### III. СПОСОБЫ ОБРАЗОВАНИЯ $C_3'$ — $C_5'$ -МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ

#### 1. Синтез динуклеозидфосфатов с неспецифической межнуклеотидной связью

Первые попытки синтеза динуклеотидов привели к получению динуклеозидфосфатов, в которых остаток фосфорной кислоты был связан с одинаковыми углеродными атомами остатков сахара<sup>61</sup>. Так, из 2',3'-О-бензилиденуридина и монофенилдихлорфосфата после удаления защитных групп получен уридилил-(5'-5')-уридин<sup>62</sup>. При применении моно-р-нитрофенилдихлорфосфата, из 3'-О-ацетилтимидина получен тимидилл-(5'-5')-тимидин<sup>63, 64</sup>. Аденилил-(5'-5')-уридин получен из защищенной соответствующим образом серебряной соли аденоzin-5'-фосфата и 2',3'-изопропилиденуридина<sup>65</sup>, а также методом смешанных производных нуклеотидов монохлорангириды<sup>19</sup>, получили аденилил-(2'-5')-уридин<sup>5</sup>, а также первый динуклеозидфосфат с  $C_3'$ — $C_5'$ -связью — тимидилл-(3'-5')-тимидин<sup>19</sup>. Тем не менее способ не получил распространения, так как выход динуклеозидфосфата незначителен, а получение и очистка промежуточных соединений затруднительны. В многочисленных опытах по синтезу динуклеозидфосфатов и тринуклеозидфосфатов из различных производных аденоzина, гуанозина и цитидина при участии дифенилхлорфосфата были получены смеси веществ, содержащих  $C_2'$ — $C_5'$ - и  $C_3'$ — $C_5'$ -связи<sup>54</sup>. Перечисленные методы синтеза динуклеозидфосфатов приводят к соединениям с неспецифической межнуклеотидной связью, или требуют трудно доступных исходных веществ.

#### 2. Карбодиимидный метод синтеза $C_3'$ — $C_5'$ межнуклеотидной связи

Значительно эффективнее оказался метод, предусматривающий прямую конденсацию нуклеозидного и нуклеотидного компонентов в присутствии активирующих средств. Наиболее широко в качестве активирующего агента применяется ДЦК, избыток которого не вызывает побочных реакций, а образующаяся дициклогексимочевина легко удаляется из реакционной смеси. Используя для реакции различные нуклеозидные и нуклеотидные компоненты (см. табл. 1), Корана и сотрудники<sup>16</sup> показали, что при применении эквимолекулярных количеств обоих компонентов и 5-кратного избытка ДЦК скорости реакции примерно одинаковы, и выходы варьируют в пределах 60—76 %. Следует, однако, отметить, что как скорость реакции, так и выход в значительной степени зависят от величины защитной группы в нуклеотидном компоненте<sup>67, 68</sup> (см. табл. 2) \*.

100 %-ный избыток одного компонента повышает выход до 96—100 % в расчете на второй компонент<sup>14</sup>. Прибавление второго моля нуклеотидного компонента в конце реакции не увеличивает выхода, в то время как прибавление второго моля нуклеозидного компонента в конце реакции делает выход почти количественным. Предполагают, что нуклеозидный компонент становится недоступным вследствие побочной реакции<sup>14, 68</sup>. При реакции дезоксирибонуклеотидов конденсация протекает одинаково независимо от того, с каким углеродным атомом углеводного остатка связаны реагирующие группы<sup>14</sup>, однако отдают предпочтение конденсации 5'-фосфатов нуклеозидов с нуклеозидами, имею-

\* Более подробные сведения о кинетике синтеза  $C_3'$ — $C_5'$ -связи в присутствии ДЦК имеются в работе Кораны и сотрудников<sup>69</sup>, опубликованной после написания обзора.

ТАБЛИЦА 1  
Получение динуклеозидфосфатов конденсацией в присутствии ДЦК

Нуклеозидный компонент	Нуклеотидный компонент	Динуклеозидфосфат, выход, %
5'-О-ди- <i>p</i> -АФМ-тимидин	3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат	ТфТ*, 75—76
То же	N <sub>1</sub> O <sup>3'</sup> -диацетилдезоксигуанозин-5'-фосфат	ТфДГ, 68
» »	N <sub>1</sub> O <sup>3'</sup> -диацетилдезоксиаденозин-5'-фосфат	ТфДА, 70
N-анизил-О <sup>5'</sup> -ди- <i>p</i> -АФМ-дезоксицитидин	3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат	дЦфТ, 75
То же	N-анизил-О <sup>3'</sup> -ацетилдезоксицитидин-5'-фосфат	дЦфДЦ, 73
N-бензоил-О <sup>5'</sup> -ди- <i>p</i> -АФМ-дезоксицитидин	N <sub>1</sub> O <sup>3'</sup> -диацетилдезоксигуанозин-5'-фосфат	дЦфДГ, 97
N <sub>1</sub> O <sup>5'</sup> -Бис(ди- <i>p</i> -АФМ)-дезоксигуанозин	3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат	дГфТ, 67
То же	N-анизил-О <sup>3'</sup> -ацетил-дезоксицитидин-5'-фосфат	дГфДЦ, 64
» »	N <sub>1</sub> O <sup>3'</sup> -диацетилдезоксигуанозин-5'-фосфат	дГфДГ, 60
N-бензоил-О <sup>5'</sup> -ди- <i>p</i> -АФМ-дезоксиаденозин	3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат	дАфТ, 70

\* О номенклатуре и сокращенных обозначениях полинуклеотидов см. <sup>61</sup>.

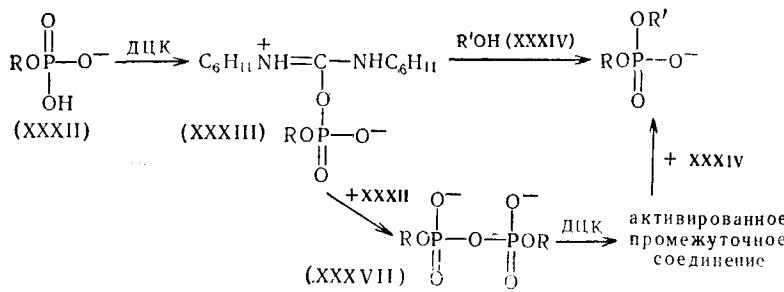
ТАБЛИЦА 2  
Влияние величины защитной группы в нуклеотидном компоненте на выход динуклеозидфосфата

Нуклеотидный компонент	Нуклеозидный компонент	Выход динуклеозидфосфата, %
3'-О-Ацетилтимидин-5'-фосфат	5'-О-ацетилтимидин или 5'-О-три-титлтимидин	60
5'-О-Тритилтимидин-3'-фосфат	3'-О-ацетилтимидин	45
5'-О-Ацетилтимидин-3'-фосфат	То же	81
5'-О-Триметилацетил-тимидин-3'-фосфат	» »	73
5'-О-Мезитоилтимидин-3'-фосфат	» »	60
N <sub>1</sub> O <sup>3'</sup> -Бис (ди- <i>p</i> -АФМ)-дезоксигуанозин-5'-фосфат	5'-О-ди- <i>p</i> -АФМ-тимидин	12

щими свободной 3'-ОН, так как дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты доступнее 3'-фосфатов, а производные дезоксирибонуклеозидов со свободной 5'-ОН в ряде случаев нестабильны. Для специфического синтеза дигибонуклеозидфосфатов, напротив, приемлемее путь, включающий конденсацию защищенного рибонуклеозид-3'-фосфата с рибонуклеозидом, имеющим свободной 5'-ОН, так как рибонуклеозиды со свободной 3'-ОН практически недоступны<sup>26</sup>.

Изучен механизм образования фосфодиэфирной связи при конденсации соответствующих производных нуклеотидов и нуклеозидов в присутствии ДЦК<sup>15, 42, 67—71</sup>. Предполагают, что первой стадией реакции является активация нуклеотидного компонента (XXXII) с образо-

ванием протонированного аддукта (XXXIII), при алкоголизе которого избыtkом нуклеозидного компонента (XXXIV) образуется динуклеозидфосфат (XXXV). XXXIII или метафосфат из него (XXXVI) предпочтительно образуют пирофосфат (XXXVII), если используют стехиометрические количества XXXII и XXXIV. Действительно, изучая реакцию 5'-O-ацетилтимидина (XXXVIII) с 3'-O-ацетилтимидин-5'-фосфатом (XXXIX), Корана и сотрудники<sup>15</sup> показали, что в первые несколько минут образуется Р<sup>1</sup>, Р<sup>2</sup>-ди-(3'-O-ацетилтимидин-5')-пирофосфат (XL). Так как пирофосфаты не эффективны как фосфорилирующие агенты, следующей стадией синтеза должна быть дальнейшая активация XXXVII. Эта активация ингибируется водой или сильными основаниями (такими как три-*n*-бутиламин), добавление которых приводит к тому, что конечными продуктами реакции оказываются пирофосфаты<sup>70</sup>, что и было широко использовано для синтеза коферментов и родственных соединений<sup>72</sup>:



При исследовании веществ, получающихся при обработке XXXIX и XL ДЦК в сухом пиридине в течение 10—30 минут, установлено<sup>68</sup>, что основным продуктом реакции в обоих случаях является Р<sup>1</sup>, Р<sup>2</sup>, Р<sup>3</sup>-три-(3'-O-ацетилтимидин-5')-трифосфат (XL, R=3'-O-ацетилтимидин-5'). Считают, что действительно активным фосфорилирующим промежуточным соединением служит не XL, а триметафосфат (XLII), который легко превращается в XL в присутствии воды<sup>67, 68</sup>. Поскольку триметафосфаты очень лабильны<sup>72, 73</sup>, не удалось непосредственно показать присутствие XLII (R=3'-O-ацетилтимидин-5') в реакционной смеси. Однако модельные опыты с более доступной этилфосфорной кислотой подтвердили образование XLII (R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), идентичного с соединением, полученным предварительно из триметафосфата серебра и этилиодида<sup>73</sup>. Мономерный метафосфат XXXVI, рассматриваемый Тоддом как промежуточный фосфорилирующий агент<sup>74, 75</sup>, вероятно, может образоваться как кратковременное промежуточное соединение, но, по мнению Кораны<sup>68</sup>, следует ожидать, что он будет скорее атакован вторым фосфатным анионом XXXII, чем нейтральной окси-группой XXXIV. Возможные пути превращения XXXII в XLII представлены на схеме<sup>68</sup> (см. страницу 95).

### 3. Применение других реагентов для синтеза специфической C<sub>3'</sub>—C<sub>5'</sub>-межнуклеотидной связи

Кроме ДЦК, в качестве активирующих агентов для синтеза C<sub>3'</sub>—C<sub>5'</sub>-связи предложены *p*-толуолсульфохлорид<sup>13</sup>, мезитиленсульфохлорид<sup>76</sup>, трихлорацетонитрил<sup>77</sup>, карбонилдимиазол<sup>78, 79</sup>, этоксиацетилен<sup>80-83</sup>, соли N-алкил (метил- или этил-) -5-фенилизоксазолия<sup>84-86 \*</sup>.

\* Опубликованы<sup>87</sup> также результаты применения для этой цели этилметафосфата<sup>88, 89</sup> и продукта присоединения фосгена к диметилформамиду<sup>90, 91</sup>. Выяснено, что первый практического значения для синтеза C<sub>3'</sub>—C<sub>5'</sub>-связи не имеет, а второй образует динуклеозидфосфат с выходом 30—40%, причем возможны побочные реакции.

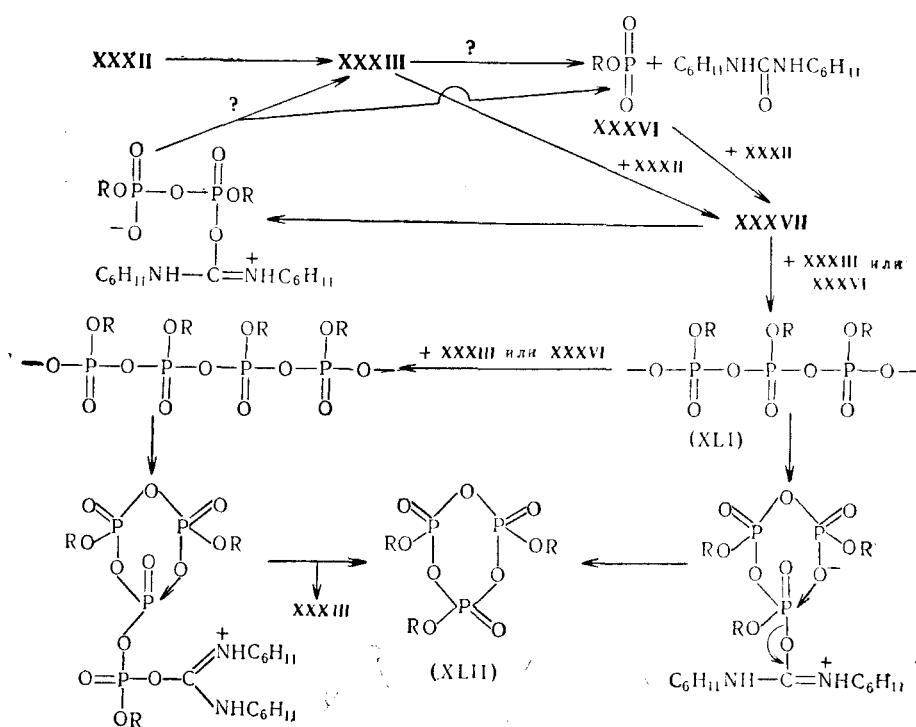
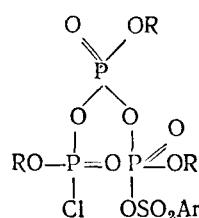


Схема образования триметафосфата (XLII) изmonoалкилфосфата (XXXII)

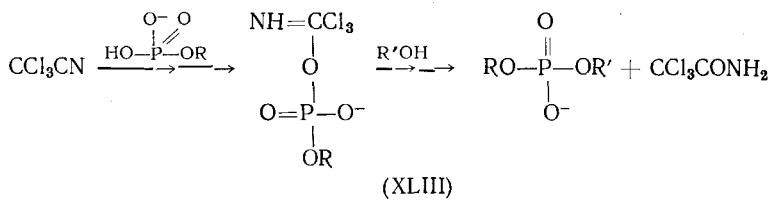
Конденсация нуклеозидного и нуклеотидного компонентов в присутствии *p*-толуолсульфохлорида дает хорошие выходы динуклеозидфосфатов<sup>15</sup>, однако избыток реагента вызывает образование побочных продуктов, в частности смеси полимеров. Механизм образования фосфодиэфирной связи в присутствии *p*-толуолсульфохлорида подробно не изучался, но высказано предположение, что природа первоначального фосфорилирующего агента та же, что и при конденсации в присутствии ДЦК<sup>68</sup> \*.

При растворении моноэфира фосфорной кислоты в смеси трихлор-ацетонитрила и пиридина образуются реакционноспособные промежу-

\* Согласно последним данным<sup>67</sup>, фосфорилирующий агент в этом случае значительно более реакционноспособен, чем при конденсации в присутствии ДЦК, и, по-видимому, представляет собой продукт присоединения сульфохлорида к триметафосфату:

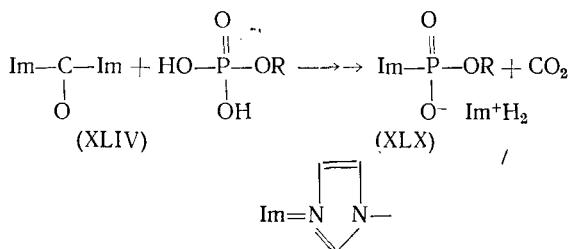


точные соединения — имидоилфосфаты (XLIII)<sup>92-95</sup>, дающие со спиртами несимметричные диэфиры фосфорной кислоты:



Эти наблюдения казались весьма интересными для использования их в разработке способов синтеза C<sub>3</sub>—C<sub>5</sub>-фосфодиэфирной связи. Однако первая попытка получить тимидилил-(3'-5')-тимидин, конденсируя 5'-О-тритилтимидин-3'-фосфат с 3'-О-ацетилтимидином в присутствии трихлорацетонитрила в течение 64 часов при комнатной температуре, оказалась неудачной: главным продуктом реакции был P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-дитимидин-3'-пирофосфат<sup>14</sup>.

Карбонилдииимиазол (XLIV)<sup>78, 79</sup>, реагируя с моноэфирами фосфорной кислоты, количественно превращается в имидазолиды (XLV), легко выделяющиеся в виде солей и обладающие ацилирующими свойствами<sup>96</sup>:



XLV образует со спиртами фосфодиэфиры. Приложения в области синтеза C<sub>3</sub>—C<sub>5</sub>-связи пока не известны\*.

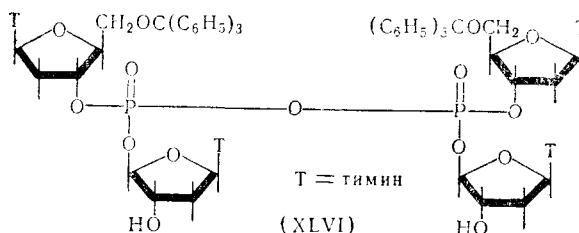
Для сравнения различных реагентов была изучена реакция образования тимидилил-(3'-5')-тимидина из: а) 5'-О-ацетилтимидин-3'-фосфата и 3'-О-ацетилтимидина или б) из XXXIX и 5'-О-тритилтимидина, взятых в стехиометрических количествах, в пиридине при комнатной температуре в присутствии 100%-ного избытка *p*-толуолсульфохлорида и мезитиленсульфохлорида и 4-кратного избытка ДЦК, этоксиацетилена и N-этил-5'-фенилизоксазолфторбората<sup>87, 97</sup>. Выяснилось, что этоксиацетилен образует по методу (а) за 96 часов симметричный пирамидофосфат. Соль изоксазолия и ДЦК дают примерно одинаковый выход динуклеозидфосфата (68%). Наиболее эффективны для метода (б) сульфохлориды: выход тимидилил-(3'-5')-тимидина в присутствии *p*-толуолсульфохлорида составил 78% за 6 часов, в присутствии мезитиленсульфохлорида 71% за 1 час и 90% за 20 часов. Использование таких реагентов как мезитиленсульфохлорид позволяет применять для синтеза более растворимые триалкиламмониевые соли мононуклеотидов, что невозможно в случае ДЦК и солей изоксазолия, когда триалкиламины, как уже отмечалось, приводят к образованию пирамидофосфатов<sup>70</sup>.

\* Первая попытка получить динуклеозидфосфат не дала положительных результатов<sup>87</sup>.

#### 4. Синтез олигонуклеотидов с $C_3'$ — $C_5'$ -связью

Методы синтеза олигонуклеотидов со специфической межнуклеотидной связью должны предусматривать образование такой связи, когда нуклеозидный или нуклеотидный компоненты или оба компонента одновременно уже содержат фосфодиэфирные связи.

Корана и сотрудники<sup>14, 42</sup> установили, что для получения высокомолекулярных смешанных олигонуклеотидов можно использовать обычные методы синтеза динуклеозидфосфатов. Рассмотрены три варианта общей методики. В первом варианте<sup>42</sup> готовая фосфодиэфирная связь содержалась в нуклеозидном компоненте: 5'-О-тритилтимидин-(3'-5')-тимидин обрабатывали в пиридине избытком ДЦК в течение часа, чтобы избежать образования ангидрида типа **XLVI**, а затем двумя молярными эквивалентами 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата в течение двух дней при комнатной температуре. После обработки щелочью для удаления ацетильной группы был получен 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидин с выходом 68%, гидрирование ко-



торого дало тимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидин (83%). Аналогично получен тимидил-(3'-5')-дезоксиадениил-(3'-5')-дезоксицитидин<sup>42</sup> и тимидил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидин<sup>98</sup>.

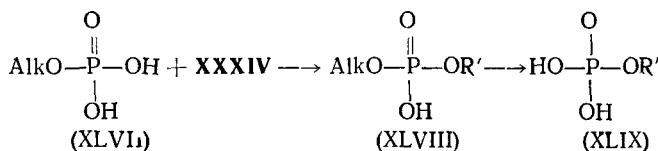
Во втором варианте готовую фосфодиэфирную связь содержал нуклеотидный компонент: 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидин был получен карбодиимидным методом с выходом 49% из 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидин-3'-фосфата и 3'-О-ацетилтимидина. Наконец, была проведена конденсация, при наличии в обоих компонентах фосфодиэфирной связи: 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидин был получен из 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидин-3'-фосфата и тимидил-(3'-5')-3'-О-ацетилтимидина с выходом 23%<sup>14\*</sup>. Структура олигонуклеотидов во всех случаях подтверждалась ферментативным гидролизом. Таким образом, при ступенчатом синтезе полинуклеотидов можно удлинять цепь, используя компоненты, уже содержащие межнуклеотидные связи. Оптимальные условия для ступенчатого синтеза олигонуклеотидов со специфической межнуклеотидной связью нельзя считать окончательно установленными. В частности, следует иметь в виду, что растворимость промежуточных соединений уменьшается с увеличением длины цепи, что должно усложнить требования к защитным группам.

\* Недавно появились сообщения о получении двух тририбонуклеотидов<sup>99, 100</sup>: уридилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридина (выход 80%) и аденилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридина (выход 75%), двух тетрануклеотидов: тимидил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидина<sup>101</sup> (выход 59%) и уридилил-(3'-5')-аденилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридина<sup>100</sup> (выход 75%), а также двух пентануклеотидов: тимидил-(3'-5')-дезоксиадениил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидина<sup>102</sup> (выход 12%) и дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксигуанилил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидил-(3'-5')-дезоксицитидина<sup>101</sup> (выход 15–17%).

#### IV. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ СО СВОБОДНОЙ ФОСФОМОНОЭФИРНОЙ ГРУППОЙ

Истинные олигонуклеотиды, т. е. олигонуклеотиды, имеющие на конце полинуклеотидной цепи свободный остаток фосфорной кислоты, получают двумя путями: вводят остаток фосфорной кислоты в уже готовый олигонуклеотид или для синтеза фосфодиэфирной связи берут нуклеозидный компонент, в котором имеется защищенная фосфатная группа.

Для введения остатка фосфорной кислоты в олигонуклеотиды в настоящее время пользуются методом, в основе которого лежит конденсация спирта (XXXIV) и моноалкилфосфата (XLVII) в присутствии ДЦК:



XLVII выбирают таким образом, чтобы алкильная группа селективно удалялась после образования диэфира (XLVIII), так что конечным результатом реакции является превращение XXXIV в его фосфат (XLIX)<sup>103</sup>. В качестве фосфорилирующих агентов были изучены моно-бензилфосфат<sup>68, 70</sup>,  $\beta$ -цианэтилфосфат<sup>104</sup> и тетра-*p*-нитрофенилпирофосфат<sup>105</sup>. Наиболее удобным для фосфорилирования олигонуклеотидов оказался  $\beta$ -цианэтилфосфат<sup>106</sup>, который, в отличие от других фосфорилирующих агентов, стабилен и становится активным только в присутствии ДЦК. Так как ДЦК всегда применяют в большом избытке, для реакции не нужны абсолютно безводные условия. Для фосфорилирования обычно берут 1,5—2-кратный избыток  $\beta$ -цианэтилфосфата. Избыток реагента полностью разрушается при 100° в 1 N NaOH за 5 минут, в 0,1 N NaOH — за 30 минут. В нуклеотиде  $\beta$ -цианэтильная группа отщепляется за 2 минуты в 1 N NaOH при 100° и значительно медленнее, чем в самом реагенте, в 0,1 N NaOH при 50°. 2 N NaOH отщепляет цианэтильную группу в соответствующем производном динуклеотида в течение ~1 минуты при 0°<sup>14</sup>, что, по всей вероятности, можно использовать для ее селективного удаления в присутствии некоторых других защитных групп, таких как N-бензильные группы в пуриновых и пиримидиновых основаниях. Свободные аминные группы фосфорилируются  $\beta$ -цианэтилфосфатом, но образующиеся при этом фосфамидные связи легко разрушаются: в случае гуанозина и аденоцина — в слабокислой или даже нейтральной среде, для цитидина — в слабощелочной или нейтральной среде при нагревании до 100°. Гликозидные связи при этом не расщепляются. Этим методом было проведено фосфорилирование 5'-О-тритилтимидил-(3'-5')-тимидина<sup>14</sup>, который обрабатывали избытком смеси  $\beta$ -цианэтилфосфата и ДЦК, причем смесь содержала ДЦК в 3 раза больше, чем  $\beta$ -цианэтилфосфата. При эквимолекулярном соотношении указанных реагентов выход фосфорилированного продукта не превышал 23%, даже если смесь брали в 5-кратном избытке по отношению к динуклеозидфосфату. После щелочной обработки продукта фосфорилирования динуклеотид был выделен в чистом виде с 68%-ным выходом. Аналогично из тимидилил-(3'-5')-тимидина<sup>52</sup> получена 5'-О-фосфорилтимидил-(3'-5')-тимидиловая-(3') кислота и тетрануклеотид, тимидилил-(3'-5')-тимидилил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидиловой (3') кислоты<sup>14</sup>. Тимидилил-(3'-5')-тимидил-

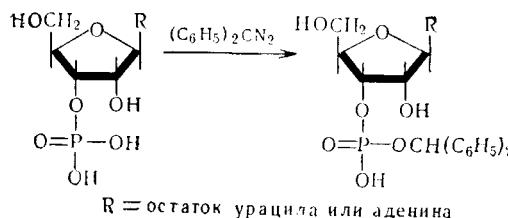
вая-(3') кислота получена также при помощи тетра-*p*-нитрофенилпирофосфата<sup>15</sup>.

В качестве фосфорилирующего агента был использован также ди-бензилхлорфосфат<sup>15</sup>: тимидил-(5'-3')-тимидиловую-(5') кислоту получили в виде Na-соли с выходом 50%. Фосфорилирование 5'-О-три-тилтимидил-(3'-5')-тимидина приводит к тимидил-(3'-5')-тимидиловой-(3') кислоте с низким выходом, что связано, вероятно, с относительной инертностью вторичной 3'-ОН.

Второй путь получения олигонуклеотидов с концевой фосфомоно-эфирной группой, с применением для синтеза олигонуклеотида нуклеозидного компонента с защищенной фосфатной группой, был применен в нескольких вариантах, отличающихся характером защитных групп в «вводимом» остатке фосфорной кислоты и условиями конденсации. Тимидил-(5'-3')-тимидин-5'-фосфат был получен из 3'-О-ацетилти-мидин-5'-фосфата и тимидин-5'-дибензилфосфата с участием ДЦК<sup>15, 18</sup>. Бензильные группы удаляли гидрированием в 10%-ной уксусной кислоте в присутствии окиси палладия на BaSO<sub>4</sub><sup>107</sup>, ацетильную — мягкой щелочной обработкой. Динуклеотид в виде кристаллической трина-триевой соли был выделен с выходом, не превышавшим 40%. Относительно низкий выход, по-видимому, обусловлен осложнениями, возни-кающими в результате монодебензилирования дибензилфосфатной группы. Понижение температуры до 0° практически не увеличило вы-ход: конденсация N,O<sup>3'</sup>-диацетилдезоксиаденозин-5'-фосфата с тими-дин-5'-дибензилфосфатом с последующим отщеплением защищенных групп дала 40% дезоксиадениил-(5'-3')-тимидин-5'-фосфата<sup>15</sup>.

Успешнее оказалось использование β-цианэтильных производных фосфатов нуклеозидов в качестве нуклеозидного компонента<sup>14</sup>: 5'-О-тритилтимидин-3'-фосфат и тимидин-3'-β-цианэтилфосфат конденси-ровали в присутствии ДЦК при различном соотношении исходных ком-понентов: 1:1, 2:1, 1:2. Выход динуклеотида был примерно одинаковым во всех опытах (55—60%). Интересно, что при соотношении 1:1 конденсация проходит лучше, если в нуклеозидном компоненте есть фосфатная группа: при использовании 3'-О-ацетилтимидина вместо тимидин-3'-β-цианэтилфосфата выход динуклеозидфосфата составил 45% вместо 55—60% для динуклеотида. Конденсацией 5'-О-тритилтими-дил-(3'-5')-тимидин-3'-фосфата с 1,5 молями тимидин-3'-β-цианэтил-фосфата был получен тимидил-(3'-5')-тимидил-(3'-5')-тимидин-3'-фосфат (44%).

Для защиты окси-групп в остатке фосфорной кислоты предложена также *трет*-бутильная группа<sup>86</sup>, которая вводится по трихлорацето-нитрильному методу<sup>108</sup>, а удаляется 20%-ной уксусной кислотой. Мож-но, кроме того, использовать для этой цели реакцию с дифенилдиазо-метаном<sup>86</sup>:



Благодаря большой величине дифенилметильного остатка, 2'-ОН-группа становится «недоступной» и не участвует в конденсации. Этот

способ использован при получении первого синтетического дирибонуклеотида — уридилил-(3'-5')-уридин-3'-фосфата<sup>108</sup>: пиридиниевую соль 5'-О-ацетил-2'-О-ТГП-уридин-3'-фосфата<sup>48</sup> вводили во взаимодействие с аммониевой солью уридин-3'-дифенилметилфосфата в присутствии 7-кратного избытка ДЦК в пиридине. Через 4 дня, после удаления защитных групп, уридилил-(3'-5')-уридин-3'-фосфат был выделен с 30%ным выходом. Аналогично синтезирован уридилил-(3'-5')-аденозин-3'-фосфат (39%).

ТАБЛИЦА 8  
Синтетические олигонуклеотиды с C<sub>3</sub>-—C<sub>5</sub>-связью

Название вещества	Ссылки на литературу	Название вещества	Ссылки на литературу
Тимидилил-(3'-5')-тимидин	13—16,69	Тимидилил-(3'-5')-тимидин-3'-фосфат	15
Тимидилил-(3'-5')-дезоксигуанозин	16,69	Уридилил-(3'-5')-уридин-3'-фосфат	108
Тимидилил-(3'-5')-дезоксиаденозин	15,16,42,69	Уридилил-(3'-5')-аденозин-3'-фосфат	108
Тимидилил-(3'-5')-дезоксицитидин	15	Тимидилил-(3'-5')-тимидилил-(3'-5')-тимидин	14,42
Дезоксицитидилил-(3'-5')-тимидин	15,16,69	Тимидилил-(3'-5')-дезоксиаденилил-(3'-5')-дезоксицитидин	42
Дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксицитидин	16,69	Уридилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридин	99,100
Дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксигуанозин	16,69	Аденилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридин	99,100
Дезоксигуанилил-(3'-5')-дезоксицитидин	16,69	5'-Фосфат-тимидилил-(3'-5')-дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксицитидин	98
Дезоксигуанилил-(3'-5')-тимидин	16,69	Тимидилил-(3'-5')-тимидилил-(3'-5')-тимидилил-(3'-5')-тимидин	14
Дезоксигуанилил-(3'-5')-дезоксигуанозин	15,16,69	Тимидилил-(3'-5')-дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксицитидин	101
Дезоксиаденилил-(3'-5')-тимидин	15,16,69	Уридилил-(3'-5')-аденилил-(3'-5')-уридилил-(3'-5')-уридин	100
Уридилил-(3'-5')-уридин	7,36	Тимидилил-(3'-5')-дезоксиаденилил-(3'-5')-дезоксицитидин	102
Аденилил-(3'-5')-аденозин	26	Тимидилил-(3'-5')-тимидилил-(3'-5')-тимидин	102
Уридилил-(3'-5')-цитидин	26	Дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксигуанилил-(3'-5')-дезоксицитидилил-(3'-5')-дезоксицитидин	101
Уридилил-(3'-5')-аденозин	7,26		
Цитидилил-(3'-5')-уридин	49		
Уридилил-(3'-5')-азауридин	48		
Цитидилил-(3'-5')-азауридин	49		
5'-Фосфаттимидилил-(3'-5')-тимидин	15,18		
5'-Фосфаттимидилил-(3'-5')-дезоксиаденозин	15,18		

В одной из последних работ по ступенчатому синтезу олигонуклеотидов с C<sub>3</sub>-—C<sub>5</sub>-связью<sup>98</sup> для введения концевой фосфомоноэфирной группы предложено использовать трансфосфорилирование, применяя фенилфосфат и соответствующий фермент<sup>109</sup>.

Все синтезированные олигонуклеотиды, начиная с динуклеозидфосфатов, приведены в табл. 3.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Молекулярная генетика, Сб. под ред. И. Л. Куняцца и С. И. Алиханяна, ИЛ, Москва, 1963.
- Н. К. Кочетков, И. В. Торгов, М. М. Ботвицник, Химия природных соединений, Изд. АН СССР, 1961, стр. 248.
- Там же, стр. 177, 178.
- Там же, стр. 176.
- A. M. Michelson, L. Szabo, A. R. Todd, J. Chem. Soc., 1956, 1546.

6. D. M. Braun, D. J. Magrath, A. H. Neilson, A. R. Todd, *Nature*, **177**, 1124 (1956).
7. M. Smith, H. Rammier, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 430 (1962).
8. H. Bredereck, *Ber.*, **65B**, 1830 (1932).
9. H. Bredereck, *Tam же*, **66B**, 198 (1933).
10. H. Bredereck, *Ztschr. physiol. Chem.*, **223**, 61 (1934).
11. P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.*, **104**, 385 (1934).
12. P. A. Levene, R. S. Tipson, *Tam же*, **105**, 419 (1934).
13. H. G. Khorana, G. M. Tener, J. M. Moffat, *Chem. a. Ind.*, **1956**, 1523.
14. G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 419 (1962).
15. P. T. Gilham, H. G. Khorana, *Tam же*, **80**, 6212 (1958).
16. H. Schaller, H. G. Khorana, *Chem. a. Ind.*, **1962**, 699.
17. H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3821 (1963).
18. H. G. Khorana, W. E. Razzell, P. T. Gilham, G. M. Tener, E. H. Pol, *Tam же*, **79**, 1002 (1957).
19. A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2632.
20. A. M. Michelson, A. R. Todd, *Tam же*, **1949**, 2476.
21. D. M. Brown, A. Todd, S. Varadarajan, *Tam же*, **1956**, 2390.
22. S. Chladek, J. Smrt, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **28**, 1301 (1963).
23. M. Smith, *Biochem. Preparations*, **8**, 130 (1961).
24. D. M. Brown, A. R. Todd, S. Varadarajan, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2388.
25. G. M. Kenner, A. R. Todd, R. F. Webb, F. J. Weymouth, *Tam же*, **1954**, 2288.
26. D. H. Rammier, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3112 (1962).
27. D. M. Brown, A. R. Todd, S. Varadarajan, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2384.
28. J. Žemlička, J. Beránek, J. Smrt, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **27**, 2784 (1962).
29. R. K. Blackwood, H. H. Rennhard, Ch. R. Stephens, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5194 (1960).
30. K. Miyatake, A. Okano, K. Hoji, T. Miki, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 524 (1961).
31. Z. Arnold, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **24**, 4048 (1959).
32. D. M. Brown, L. Hough, J. K. N. Jones, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 1125.
33. E. J. Bourne, A. J. Huggard, J. C. Tatlow, *Tam же*, **1953**, 735.
34. R. K. Ness, H. G. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4710 (1956).
35. A. Doerschuk, *Tam же*, **74**, 4204 (1952).
36. M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2911 (1959).
37. D. Lipkin, P. T. Talbert, *Chem. a. Ind.*, **1955**, 143.
38. A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3459.
39. M. Smith, G. I. Drummond, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 693 (1961).
40. W. Andersen, D. H. Hayes, A. M. Michelson, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1882.
41. D. L. MacDonald, H. G. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3719 (1959).
42. P. T. Gilham, H. G. Khorana, *Tam же*, **81**, 4647 (1959).
43. H. Lund, *Tam же*, **49**, 1346 (1927).
44. D. M. Brown, D. J. Magrath, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1442.
45. D. H. Rammier, H. G. Khorana, *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 147 (1962).
46. D. H. Rammier, H. G. Khorana, *Tam же*, **8**, 61 (1962).
47. J. Smrt, J. Beránek, F. Šorm, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **25**, 2549 (1960).
48. J. Smrt, F. Šorm, *Tam же*, **27**, 73 (1962).
49. J. Smrt, F. Šorm, *Tam же*, **28**, 61 (1963).
50. Y. Lapidot, H. G. Khorana, *Chem. a. Ind.*, **1963**, 166.
51. A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 34.
52. H. G. Khorana, A. F. Turner, J. P. Vizsolyi, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 686 (1961).
53. G. M. Tener, *Tam же*, **83**, 159 (1961).
54. A. M. Michelson, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 3655.
55. R. K. Ralph, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2926 (1961).
56. H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, *Tam же*, **81**, 4660 (1959).
57. P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.*, **121**, 131 (1937).
58. G. M. Kellermann, *Tam же*, **231**, 431 (1958).
59. H. R. Bentley, K. G. Cunningham, F. S. Spring, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 2301.
60. F. Weygand, F. Wirth, *Ber.*, **85**, 1000 (1952).
61. Г. Г. Корана, сб. Нуклеиновые кислоты, под ред. Э. Чаргаха и Дж. Дэвисона, ИЛ, Москва, 1962.
62. J. M. Guland, H. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1532.
63. A. E. Turner, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4651 (1959).

64. W. E. Razzel, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2105 (1959).
65. D. T. Elmore, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3681.
66. R. H. Hall, A. R. Todd, R. E. Webb, *Там же*, **1957**, 3291.
67. G. Weimann, H. G. Khorana, *Chem. a. Ind.*, **1962**, 271.
68. G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4329 (1962).
69. H. Schaller, H. G. Khorana, *Там же*, **85**, 3828 (1963).
70. M. Smith, J. C. Moffat, H. G. Khorana, *Там же*, **80**, 6204 (1958).
71. H. G. Khorana, Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest, New York, 1961.
72. M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1141 (1958).
73. F. Cramer, H. H. Ettler, *Ber.*, **91**, 1181 (1958).
74. A. R. Todd, *Proc. Nation. Acad. Sci.*, **45**, 1389 (1959).
75. A. R. Todd, *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 187.
76. H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, R. K. Ralph, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 414 (1962). (1962).
77. F. D. Cramer, G. Weimann, *Chem. a. Ind.*, **1960**, 46.
78. H. A. Staab, *Angew. Chem.*, **68**, 754 (1956).
79. H. A. Staab, H. Schaller, F. Cramer, *Там же*, **71**, 736 (1959).
80. H. Wassermann, *Chem. a. Eng. News*, **40**, 47 (1962).
81. J. F. Arens, H. C. Volger, *Rec. trav. chim. Pays-Bas*, **77**, 1170 (1958).
82. H. H. Wasserman, P. S. Wharton, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 661 (1960).
83. H. H. Wasserman, D. Cohen, *Там же*, **82**, 4435 (1960).
84. R. B. Woodward, R. A. Olofson, *Там же*, **83**, 1007 (1961).
85. R. B. Woodward, R. A. Olofson, H. Mayer, *Там же*, **83**, 1010 (1961).
86. F. Cramer, H. Neunhoeffer, K. H. Scheit, J. Tennigkeit, *Angew. Chem.*, **74**, 387 (1962).
87. T. M. Jacob, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1630 (1964).
88. K. Langheld, *Ber.*, **43**, 1857 (1910).
89. G. Schramm, H. Grottsch, W. Pollmann, *Angew. Chem.*, **74**, 53 (1962).
90. M. Zaoral, Z. Arnold, *Tetrahedron Letters*, **1960**, No 14, 9.
91. H. H. Boshard, R. Mory, M. Schmid, H. Zollinger, *Helv. chim. Acta*, **42**, 1653 (1959).
92. F. Atherton, A. Morrison, R. Gremlyn, G. Kenner, A. Todd, R. Webb, *Chem. a. Ind.*, **1955**, 1183.
93. G. Kenner, C. Reese, A. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 546.
94. G. Kenner, A. Todd, R. Webb, *Там же*, **1956**, 1231.
95. B. Chase, G. Kenner, A. Todd, *Там же*, **1956**, 1371.
96. H. A. Staab, *Ber.*, **89**, 1927 (1956).
97. T. M. Jacob, H. G. Khorana, *Chem. a. Ind.*, **1962**, 932.
98. G. Scheurbrandt, A. M. Duffield, A. L. Nussbaum, *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 152 (1963).
99. Y. Lapidot, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1365 (1963).
100. Y. Lapidot, H. G. Khorana, *Там же*, **85**, 3852 (1963).
101. H. Schaller, H. G. Khorana, *Там же*, **85**, 3841 (1963).
102. G. Weimann, H. Schaller, H. G. Khorana, *Там же*, **85**, 3835 (1963).
103. P. T. Gilham, G. M. Tener, *Chem. a. Ind.*, **1959**, 542.
104. E. Cherbuliez, J. Rabinowitz, *Helv. Chim. Acta*, **39**, 1461 (1956).
105. R. W. Chambers, J. G. Moffat, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3747 (1957).
106. F. Cramer, G. Weimann, *Ber.*, **94**, 996 (1961).
107. R. Kuhn, H. J. Hass, *Angew. Chem.*, **67**, 785 (1955).
108. F. Cramer, K. H. Scheit, *Angew. Chem.*, **74**, 717 (1962).
109. G. Brawerman, E. Chargaff, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2020 (1953).

Институт биологической физики  
АН СССР