

УДК 571.113.6 : 542.95

ФОСФИТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Карпышев Н. Н.

Рассмотрены работы за 1983—1986 гг. в области синтеза олигодезоксирибонуклеотидов с использованием нуклеозидных производных фосфористой кислоты. Основное внимание уделяется способам получения исходных мономеров для конденсации. Приведены отдельные стадии твердофазного фосфитного цикла, обсуждается перспективность различных направлений его совершенствования. Проанализированы также работы по синтезу олигонуклеотидов с использованием моноэфиров фосфористой кислоты (фосфонатный синтез).

Библиография — 101 ссылка.

Оглавление

I. Введение	1546
II. Синтез нуклеозидамидофосфитов	1546
III. Реакции и реагенты твердофазного фосфиттриэфирного цикла	1553
IV. Нуклеозидфосфиты в синтезе олигонуклеотидов (фосфонатный синтез)	1559
V. Фосфитные реагенты для введения в олигонуклеотиды различных функциональных групп	1561

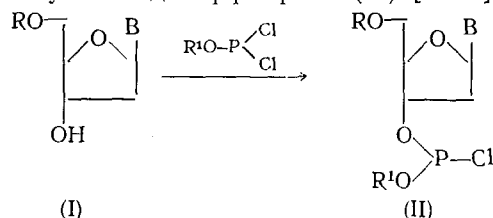
I. ВВЕДЕНИЕ

Химический синтез фрагментов ДНК имеет важное значение для развития молекулярной биологии и геной инженерии. Многочисленные коммерческие организации ряда высокоразвитых стран предлагают наборы реагентов и эффективные автоматические синтезаторы, а также свои услуги в поставке олигодезоксирибонуклеотидов¹ с заданной последовательностью. Вместе с тем во многих научных коллективах продолжается работа по совершенствованию синтетических методов, и поэтому следует ожидать дальнейшего прогресса в данной области.

Успехи твердофазного синтеза ДНК до последнего времени определяли в основном развитием химии производных трехкоординированного фосфора — нуклеозидфосфитов. Опубликованные к моменту окончания данной работы обзоры обсуждают вопросы фосфитного синтеза весьма лаконично [1—5]. Основу нашего обзора составляют работы по использованию нуклеозидфосфитов в синтезе олигонуклеотидов, опубликованные в 1983—1986 гг. и касающиеся наиболее важных в практическом отношении аспектов такого синтеза.

II. СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДАМИДОФОСФИТОВ

Как известно, первыми мономерными единицами в твердофазном фосфитном синтезе были получаемые реакцией нуклеозидов² (I) с алкилди-хлорфосфитами нуклеозидхлорфосфиты (II) [6—8]:



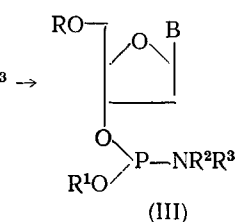
¹ Префикс d (дезокс) далее везде для краткости опущен.

² При написании формул приняты условные обозначения: (CH₃O)₂Tg—4,4'-димерокситритил; везде, где не оговорено особо, R — триарилметил, R¹ — алкил или арил, R² и R³ — алкил, B — защищенное гетероциклическое основание нуклеозида.

процесса стоит необходимость ис-
 8° С) для уменьшения побочных ре-
 ойчивость мономеров (II) в процес-
 ени некоторые группы продолжали
 атегии [9], всеобщее признание за-
 ащаемые в активные интермедиаты
 слотного характера [10]. Работа с
 ся относительной простотой, они мо-
 достижимых условиях месяцы, если
 несколько способов и модификаций
 ов (III). Разумеется, не все эти мо-
 ние на практике, однако все они яв-
 луту ко все более эффективному и
 теза ДНК.

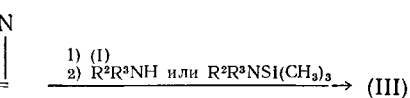
Синтез мономеров

способ получения амидофосфитов (III)
 ощего нуклеозида (I) с фосфорили-
 :

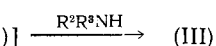


рующего агента (IV) метод доста-
 с синтезом обычных амидофосфитов
 некоторых нешаблонных задач, на-
 еобычных нуклеозидов [18], и даже

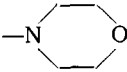
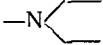
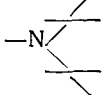
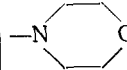
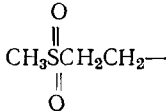
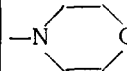
вано и охарактеризовано значитель-
 Основные сведения о некоторых из
 тее получение соединений (IV) явля-
 сным (из-за их чрезвычайной реак-
 , при наличии достаточно тяжелых
 IV) не удастся очистить перегонкой.
 иантов синтеза нуклеозидамидофос-
 ия фосфорилирующего агента (IV)
 енный дихлорфосфит обрабатываю-
 силильного производного. Получен
 последовательно с нуклеозидом (I)



в бис-триаголид достигается повы-
 зания нуклеозида (I) — уменьшение
 офита. Аналогичного результата
 леозида (I) значительным избытком
 щим внесением достаточного коли-

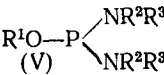


Физико-химические характеристики н

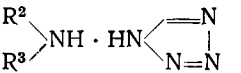
R ¹ —	—NR ² R ³	T. (M
CH ₃ —	—N(CH ₃) ₂	40—
CH ₃ —	—N 	52—
CH ₃ —	—N[CH(CH ₃) ₂] ₂	35—
CH ₃ —	—N 	28—
CH ₃ —	—N 	61—
N≡CCH ₂ CH ₂ —	—N(CH ₃) ₂	90—
N≡CCH ₂ CH ₂ —	—N[CH(CH ₃) ₂] ₂	103—
N≡CCH ₂ CH ₂ —	—N 	
	—N 	

* В скобках указан растворитель: а — дейтерохлор

Разумеется, последний способ при
но эффективного (например, хрома
целевого амидофосфита (III) из ре
Как признается основоположник
соб активации амидов (III) слабым
клеотидной связи базируется на фу
ских) исследованиях по протонирова
(см. работу [10] и ссылки в ней). К
тонирования еще продолжают диск
мешает практическому применению
вых кислот. Например, тот факт, что
ны (V) протонируются более слабы
ты (III), позволяет получать послед
агентами (V) в присутствии специал



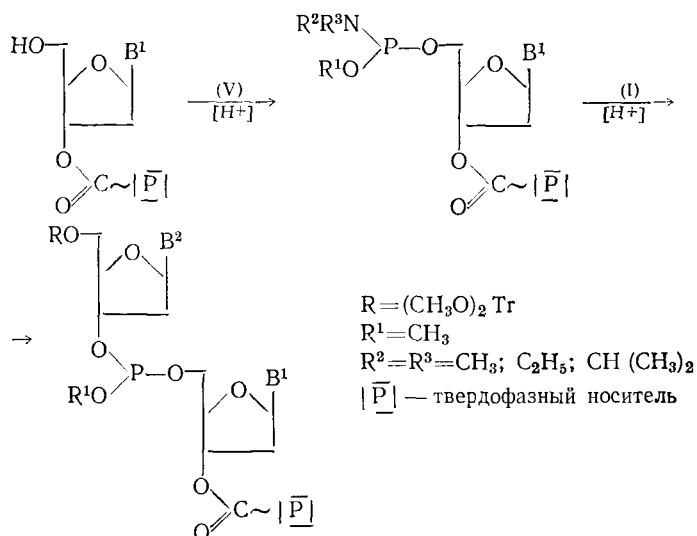
В качестве слабых кислот для актив
фина (V), R¹=CH₃, R²R³=(CH₂)₄, б
которых наилучшим оказался 4,5-ди
па исследователей [29] для селектив
=CH₃, предлагает тетразолиевые сол



Главное преимущество способа се
можности получения достаточно чист
непосредственно перед конденсацией
связанные с выделением и хранени
ров (III). Немаловажным является

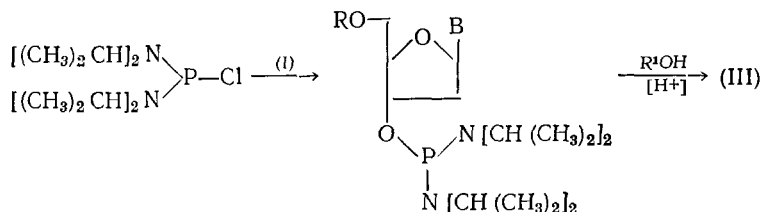
ющих амидохлорфосфитов (IV), соединения типа (V) исключительно стабильны и безопасны в работе. Из последних работ в данном направлении следует назвать использование *бис*(диалкиламида)фосфита с β -цианэтильным заместителем (V), $R^1 = \text{CNCH}_2\text{CH}_2$, $R^2 = R^3 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ [30].

Несколько иной вариант использования диамидофосфитов (V), напоминающий известные ранее способы двустадийной фосфитной конденсации [31, 32], предложен корейскими исследователями [33]:



Здесь активация (V) осуществляется вначале эквимольным количеством тетразола, и образовавшийся при этом на твердой фазе нуклеотидный компонент реагирует с находящимся в растворе защищенным (I) уже в присутствии избытка тетразола. Однако активный компонент фосфитного синтеза — амидофосфит необратимо инактивируется следами воды. Поэтому основной недостаток данного способа [33], как и более ранних [31, 32] в том, что здесь этот активный компонент связан с полимером и не может быть взят в избытке.

Недавно предложен еще один вариант синтеза амидофосфитов (III), основанный на селективной активации [34]:



Фосфорилирующий агент — *бис*(диизопропиламино)хлорфосфин достаточно устойчив и может быть очищен перегонкой в вакууме. Промежуточный *бис*(диизопропиламида)нуклеозидфосфит далее взаимодействует со спиртом $\text{R}'\text{OH}$, давая желаемый амидофосфит (III). Такой вариант полностью свободен от ограничений, связанных с трудностью получения дихлорфосфитов или диалкиламидохлорфосфитов.

Довольно типичной для большинства вышеупомянутых модификаций синтеза нуклеозидамидофосфитов (III) является стадия получения сухого порошкообразного препарата методом переосаждения или непосредственно из реакционной смеси, или после хроматографирования на колонке с силикагелем. Эта стадия весьма важна с точки зрения чистоты получаемых соединений (III), а значит, и их стабильности. Чистоту амидофосфитов проще всего проконтролировать по спектрам ЯМР ^{31}P , а иногда и методом тонкослойной хроматографии [17]. Недавно пред-

ложено для этой цели использовать масс-спектрометрию с ионизацией бомбардировкой быстрыми атомами, что позволяет детектировать молекулы примесей, не имеющих в своем составе фосфора [35]. Однако возникает вопрос, является ли получение сухих и весьма чистых амидофосфитов (III) безусловно необходимым для успешного длительного хранения и последующего использования в синтезе олигонуклеотидов. В работе [36] амидофосфиты (III) получали весьма обычным способом — взаимодействием нуклеозидов (I) с амидохлорфосфитом (IV), $R^1=R^2=R^3=CH_3$, в эквимольном соотношении в присутствии основания — этилдиизопропиламина. После удаления выпавшего гидрохлорида основания и замены растворителя (тетрагидрофурана на ацетонитрил) растворы амидофосфитов (III) использовали в твердофазном синтезе олигонуклеотидов. Еще более устойчивы полученные аналогичным способом препараты морфолидофосфитов (III), $R^1=CH_3$, $R^2R^3=(CH_2CH_2)_2O$, которые и после многомесячного хранения использовали в синтезе олигонуклеотидов различной длины, вплоть до 52-х оснований [37].

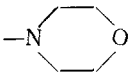
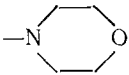
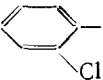
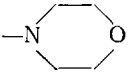
2. Влияние защитной группы при атоме фосфора и природы исходного амина на свойства нуклеозидамидофосфитов (III)

Исторически первой использованной в амидофосфитном синтезе кислотой был хлоргидрат диметиланилина, который при взаимодействии с фосфитом (III), $R^1=R^2=R^3=CH_3$, количественно (по данным ЯМР³¹P) генерировал соответствующий нуклеозидхлорфосфит (II) [10]. Естественно, на скорость протекания подобного процесса должны влиять как природа заместителей R^1 , R^2 и R^3 , так и кислотность выбранного активатора. В практическом плане амидофосфиты (III) с более электроноакцепторными заместителями при атоме Р более устойчивы при выделении и хранении и требуют для активации более сильных доноров протона. Более устойчивыми оказываются и соединения (III) с более липофильными и объемистыми заместителями при атоме N. При выборе заместителей R^1 , R^2 и R^3 следует учитывать возможные трудности при получении соответствующих фосфорилирующих агентов (IV) или предусматривать другие пути синтеза амидофосфитов (III). Основным критерием при выборе заместителя R^1 следует считать возможность его легкого и селективного удаления после синтеза олигонуклеотида.

Некоторые из известных и используемых в настоящее время мономеров (III) приведены в табл. 2. Необходимо отметить, что рассуждения относительно преимуществ тех или иных конкретных амидофосфитов (III) перед другими могут оказаться спекулятивными. Основанные на сравнении выходов на стадии конденсации, конечных выходов олигонуклеотидов, а также любых других критериях, эти рассуждения могут не учесть всего разнообразия условий конденсации, особенностей используемых твердофазных носителей, аппаратуры, наконец — авторской индивидуальности. Тем не менее, на основании опыта многих исследовательских групп практически наиболее значимыми в настоящее время можно считать диизопропиламидофосфиты (III), $R^1=CH_3$, $R^2=R^3=CH(CH_3)_2$ [11, 40] и морфолидофосфиты (III), $R^1=CH_3$, $R^2R^3=(CH_2CH_2)_2O$ [11, 15, 17]. Первые весьма устойчивы, получаются достаточно чистыми уже при простом высаживании в гексан, без использования хроматографии, и поэтому наиболее коммерчески доступны. Вторые еще более устойчивы и могут быть тщательно очищены при помощи хроматографии на силикагеле. Метильная группа в олигонуклеотидах, полученных с использованием таких амидофосфитов (III), $R^1=CH_3$, легко снимается тиофенолятом триэтиламмония. Однако ряд коллективов использует альтернативные защитные группы, удаляемые по механизму β-элиминирования в условиях полного деблокирования олигонуклеотидов (концентрированный водный аммиак, 50°): цианэтильную ($R^1=NCCCH_2CH_2$) [16], метилсульфонилэтильную ($R^1=CH_2CH_2SO_2CH_3$) [13], фенилсульфонилэтильную ($R^1=CH_2CH_2SO_2C_6H_5$) [23]. Мономеры (III) с цианэтильной группой также коммерчески доступны. Наряду с отсутствием отдельной стадии удале-

Таблица 2

Некоторые амидофосфиты (III), используемые в синтезе олигонуклеотидов

R ¹	—NR ² R ³	Способ активации (растворитель, время активации, мин)	Ссылка
CH ₃ —		5- <i>n</i> -нитрофенилтетразол (ацетонитрил, 1—3)	[38]
CH ₃ —	—N(CH ₃) ₂	тетразол(ацетонитрил, 10)	[39]
CH ₃ —	—N[CH(CH ₃) ₂] ₂	оксибензотриазол(тетрагидрофуран, 3)	[25]
C ₆ H ₅ SO ₂ CH ₂ CH ₂	—N(CH ₃) ₂	тетразол(ацетонитрил, 5)	[36]
CH ₃ SO ₂ CH ₂ CH ₂	—N[CH(CH ₃) ₂] ₂	тетразол(ацетонитрил, 5)	[40]
CH ₃ SO ₂ CH ₂ CH ₂		тетразол(ацетонитрил, 10)	[23]
NCCH ₂ CH ₂ —	—N[CH(CH ₃) ₂] ₂	оксибензотриазол (тетрагидрофуран, 3)	[13]
		5- <i>n</i> -нитрофенилтетразол (ацетонитрил, 5)	[16]
		трифторацетат <i>N</i> -метиланилина(ацетонитрил, 5)	[21]

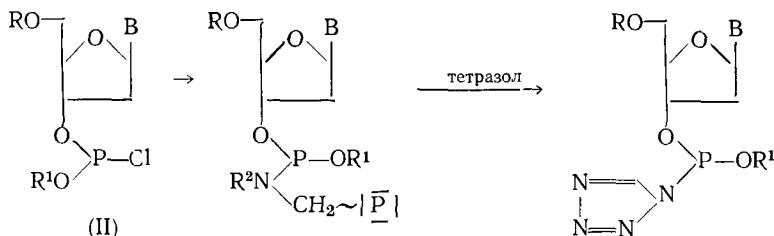
ния защитной группировки R¹ после завершения синтеза олигонуклеотида они позволяют исключить из употребления такое малопривлекательное соединение, как тиофенол. Некоторые авторы все же скептически относятся к использованию цианэтильной группы, отмечая ее нестабильность в присутствии оснований, применяемых при блокировании непрореагировавших гидроксильных групп на носителе [5].

Возможной альтернативой может служить и *o*-хлорфенильная защита [20, 21]. Такие амидофосфиты (III), R¹=C₆H₄Cl еще более стабильны, чем их метильные аналоги (III), R¹=CH₃, R²R³=(CH₂CH₂)₂O, и могут быть легко очищены на коротких колонках с силикагелем. Отмечается, что в этом случае для наращивания олигонуклеотидной цепи в твердофазном синтезе достаточно пятикратного амидофосфита по отношению к нуклеозидному компоненту на полимере, в то время как во всех остальных работах для амидофосфитов (III) с R¹=CH₃ этот избыток берется 10—20-кратным [21]. *o*-Хлорфенильная защита количественно удаляется *n*-нитробензальдоксиматом тетраметилгуанидиния, но эта процедура гораздо длительнее обработки тиофенолятом и требует последующей гель-фильтрации деблокируемого образца.

Предложены также амидофосфиты (III) с 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтильной защитной группой [R¹=C(CH₃)₂CCl₃], удаление которой может быть осуществлено в восстановительных условиях, например, трибутилфосфином или цинковой пылью [41]. Ранее эта группировка уже использовалась в хлорфосфитной стратегии [9].

3. Амидофосфиты (III), представляющие специальный интерес

Имобилизация защищенного нуклеозидхлорфосфита (II) на полистироле, содержащем NH-группы, успешно решила проблему выделения целевого амидофосфита (III) [42]. После промывки такого полимера раствором тетразола в ацетонитриле получали раствор тетразолида нуклеозидфосфита, пригодный для использования в твердофазном синтезе:

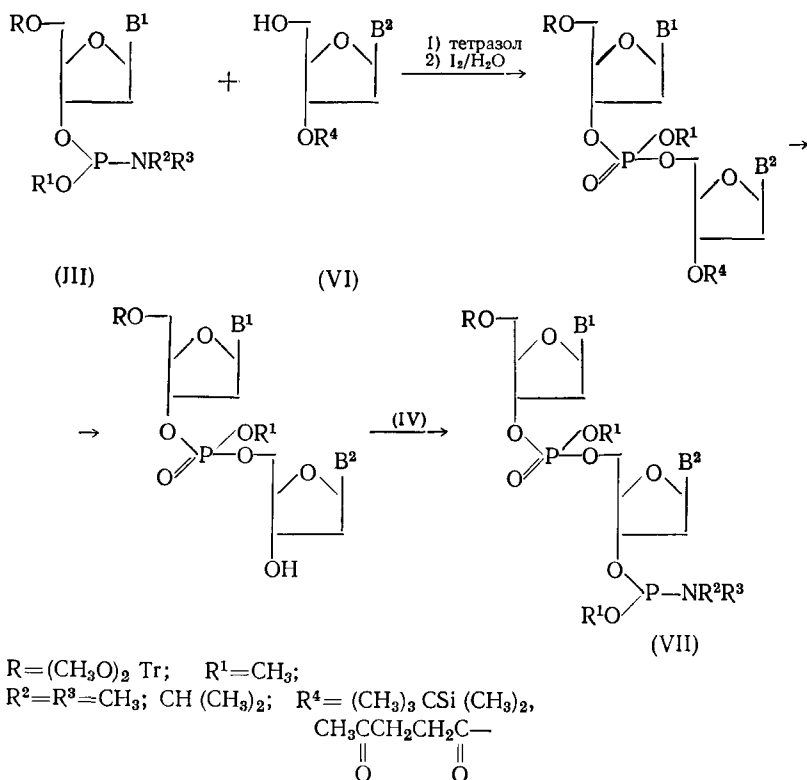


Такая остроумная схема полезна скорее при исследовании механизмов активации фосфитов (III), нежели в практическом плане.

Еще на начальных этапах становления фосфитного синтеза предлагалось проводить его без защиты экзоциклических аминогрупп гетероциклов [43]. Развитие этой идеи в приложении к амидофосфитному варианту привело к получению фосфитов (III) с незащищенными аминогруппами оснований, а также к синтезу на их основе нескольких димеров [22]. Этот подход весьма привлекателен своей быстротой и экономичностью. Однако он противоречит четкой тенденции твердофазного синтеза, в соответствии с которой защита amino- и гидроксильных групп гетероциклов становится все более надежной и изощренной, и даже в отдаленном будущем метод вряд ли сможет использоваться для получения олигонуклеотидов значительной длины. По мнению авторов [22], метод минимальной защиты мог бы найти применение при синтезе множества коротких олигомеров на целлюлозных дисках.

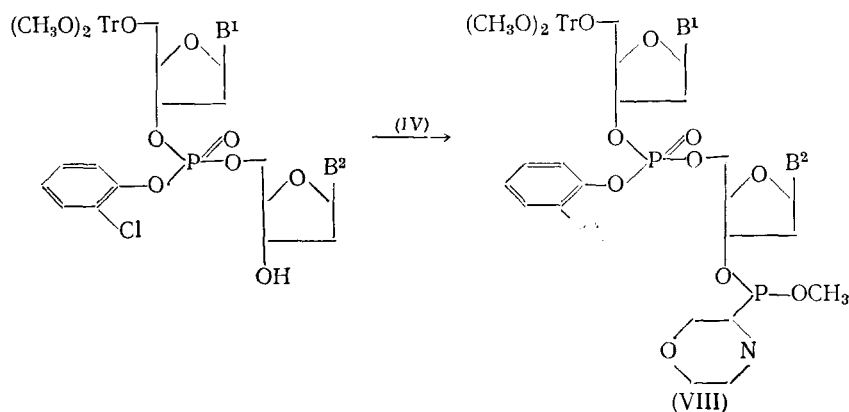
4. Амидофосфитные димерные блоки

Довольно долгое время применение готовых блоков в синтезе олигонуклеотидов являлось монополией традиционной триэфирной стратегии. Быстрота и высокий выход фосфитной конденсации, казалось бы, и при использовании мономеров (III) позволяют достичь любого желаемого результата. Однако к настоящему времени опубликован ряд работ, посвященных применению димерных блоков и в фосфитном синтезе [9, 44—49]. Межнуклеотидная связь в таких димерах обычно является фосфатной, и отличается только сам способ создания этой связи — он может быть как фосфотриэфирным, так и фосфитным с последующим окислением до фосфата. В работе [44], например, получение амидофосфитных блоков осуществляется следующим образом:



В качестве защитной группы R^4 использована левулинильная, удаляемая мягким гидразинолизом. В случае производных цитозина использование (VI) с левулинильной группой осложняется плохой раствори-

мостью такого компонента практически в любых приемлемых растворителях. Проблема решается заменой левулинильной защиты на трет-бутилдиметилсилильную. Полученные димеры высаживают холодным гексаном и хранят до использования. С применением таких димеров синтезировали ряд олигонуклеотидов длиной до 29 оснований. В другой работе [45] использовали готовые нуклеозидные блоки с *o*-хлорфенильной защитой межнуклеотидного фосфата, полученные обычным триэфирным методом. Их фосфорилирование позволило наработать 16 димерных блоков (VIII):



Блоки очищали хроматографией на колонке и охарактеризовывали при помощи спектров ЯМР³¹P.

С нашей точки зрения, обсуждаемые способы получения амидофосфитных димеров по трудозатратам приблизительно равноценны, и конкретный выбор тактики зависел, по-видимому, от того, какой техникой синтеза в растворе — фосфатной или фосфитной — лучше владели разработчики. Впрочем, наличие в олигонуклеотидах, синтезированных с использованием димеров (VIII), двух различных защитных групп по фосфору вызывает и необходимость проведения двух различных процедур деблокирования.

Несомненно, использование фосфитных блоков сопровождается увеличением выхода синтезированных олигомеров, поскольку при этом уменьшается число необходимых конденсаций, а также влияние побочных реакций. Рекорд усилий такого рода — синтез полинуклеотида, состоящего из 101 основания [48]. Однако процедура наработки блоков трудоемка, требует исключительно высокой квалификации персонала, и вряд ли фосфитные димеры найдут широкое применение в практике твердофазного синтеза. Увеличения выхода олигонуклеотидов, очевидно, можно достичь и более дешевыми способами — например, миниатюризацией процесса, увеличением концентрации мономерных амидофосфитов (III), совершенствованием процессов твердофазного цикла с целью максимального подавления побочных реакций.

III. РЕАКЦИИ И РЕАГЕНТЫ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Основное содержание фосфитного синтетического цикла на твердой фазе достаточно консервативно и представляет собой последовательность стадий детритилирования, конденсации нуклеозидного и нуклеотидного компонентов, окисления фосфита в фосфат и блокирования непрореагировавших гидроксильных групп. Однако полное время цикла за 5 лет уменьшилось с 30—60 мин до 10 и менее в современных автоматических синтезаторах. Это произошло за счет сокращения непродолжительных затрат времени в автоматах, улучшения процессов массопереноса вследствие совершенствования твердофазных носителей, а также подбора наиболее подходящих для быстрого синтеза реакций и реагентов.

1. Детритилирование и 5'-защитные группы в фосфитном синтезе

Для защиты 5'-положения нуклеотидов в фосфитном синтезе часто используется диметокситритильная группа. Удаление групп подобного рода осуществляется в кислой среде и в принципе может сопровождаться отщеплением пуриновых оснований. Данные о реальном влиянии депуринизации на состав конечных реакционных смесей в синтезе олигонуклеотидов достаточно многочисленны, но противоречивы [6, 50–55]. Сообщается, что удаление диметокситритильной группы в типичных условиях — 3%-ной трихлоруксусной кислотой в дихлорэтано — не сопровождается заметной депуринизацией за время обработки (1,5 мин за цикл) [54, 55]. Тем не менее, некоторые авторы по-прежнему предпочитают пользоваться раствором бромистого цинка в нитрометане как медленно работающим, но исключительно селективным детритилирующим агентом [45, 46].

Монометокситритильная группа еще более неудобна для твердофазного синтеза, если исходить из предполагаемой угрозы побочных реакций при детритилировании. Все же имеется вполне удачный опыт ее использования в амидофосфитном синтезе [56]. Предложены различные варианты детритилирующих растворов, позволяющие удалить монометокситритильную группу на твердой фазе так же быстро, как и диметокситритильную: 0,1 М трифторуксусная кислота в дихлорметане, 1 мин [56]; 5%-ная трихлоруксусная кислота в дихлорэтано, 3,5 мин [57]; 1 М ZnBr_2 , 0,02 М 1,2,4-триазол в смеси дихлорметан — изопропанол (85 : 15), 1,5–3 мин [58].

В работе [59] исследован ряд производных трифенилкарбинола и предложены различные защитные группировки для каждого из четырех нуклеозидов. В обычных условиях детритилирования эти группы дают растворы триарилметил-катионов различных цветов — оранжевого, голубого, красного и черного, что делает возможным визуальный контроль за последовательностью оснований синтезируемого олигомера.

Слабые кислоты, используемые для протонирования амидофосфитов, в принципе могут оказать и детритилирующее действие. Поэтому, видимо, фенилксантинильная (пиксильная) защитная группа, будучи более кислотолabileй, чем диметокситритильная [60], не пользуется популярностью у adeптов фосфитного синтеза. Собственно, набор предложенных защитных групп для 5'-конца в фосфитном синтезе не сводится только к производным триарилметанов: недавно сообщено о щелочелabileй *п*-фенилазофенилоксикарбонильной группировке [61], возможность широкого применения которой пока еще является проблематичной.

2. Блокирование непрореагировавших гидроксильных групп на носителе (кэпирование)

Так же, как и детритилирование, эта стадия не имеет принципиальных отличий в любом варианте твердофазного синтеза. В ранних работах ее осуществляли с использованием фенилизоцианата [7] или диэтилхлорфосфита [8]. В настоящее время предпочитают пользоваться практически более удобными и достаточно эффективными смесями на основе уксусного ангидрида в пиридине, лутидине или коллидине [46], особенно в присутствии нуклеофильных катализаторов — диметиламинопиридина [13, 25, 55] и *N*-метилимидазола [56]. При синтезе протяженных последовательностей эта стадия необходима, поскольку значительно облегчает последующее выделение целевых олигонуклеотидов. Как уже отмечалось в гл. II, кэпирование может быть и источником нежелательных побочных реакций в определенных условиях [5].

3. Амидофосфитная конденсация и факторы, влияющие на ее эффективность

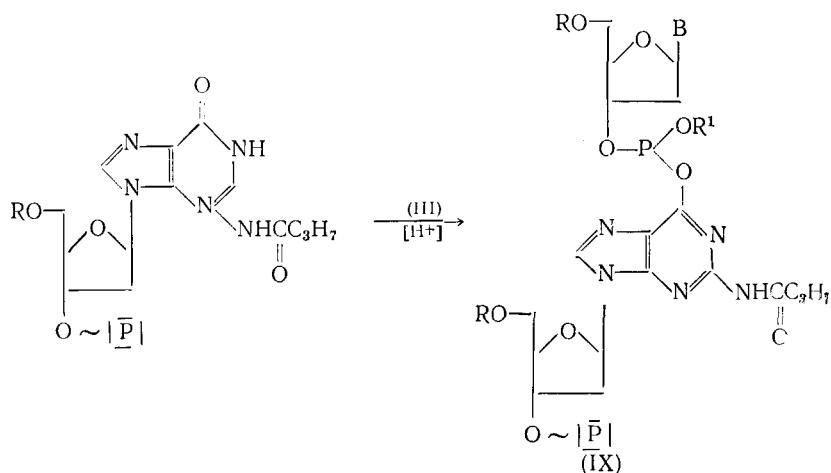
Эта стадия наиболее важна для успеха твердофазного синтеза. Процесс кислотной активации амидофосфитов вкратце рассмотрен нами в гл. II, где приводятся также слабые кислоты, обычно используемые для

этой цели (табл. 2). Наиболее часто применяется тетразол, который может быть получен в достаточно чистом и сухом виде при возгонке коммерчески доступного препарата в вакууме. Он неудобен, однако, при работе с наиболее устойчивыми соединениями типа (III), например, морфолидофосфитами (III), $R^2R^3 = (CH_2CH_2)_2O$, и в таких случаях используют более эффективные доноры протона. В выборе кислоты следует, видимо, руководствоваться следующими эмпирическими соображениями: а) хорошей растворимостью в среде; б) способностью протонировать выбранный амидофосфит (III) с практически приемлемой скоростью; в) отсутствием заметного деблокирования нуклеотидного компонента в условиях конденсации; г) химической устойчивостью рабочего раствора кислоты на протяжении всего времени синтеза олигомера.

Отличительной особенностью фосфитного синтеза является большой (10–20-кратный) избыток реагента (III) по отношению к нуклеозидному компоненту на полимере. Этот избыток необходим не только для обеспечения достаточной скорости реакции наращивания цепи, но и для компенсации расхода фосфита (III) на побочные реакции, например, с остаточной влагой растворителей (при фосфотриэфириной конденсации в традиционных вариантах эту функцию выполняет избыток конденсирующего агента). Однако при работе в микромасштабах твердофазного синтеза даже такие избытки оказываются вполне приемлемыми, а в некоторых случаях авторы идут даже на двукратное повторение каждой конденсации, что дает определенную гарантию количественного протекания процесса [28, 48, 62].

Несомненно, необходимым условием высокой эффективности конденсации является значительный избыток фосфита. Однако является ли это условие достаточным? В работе [62] на это дается вполне отрицательный ответ — на твердофазных носителях с высокой степенью модификации нуклеозидом велика роль стерических факторов. Эмпирически установлено, что предельно высокий выход на силикатных носителях обеспечивается при загрузке нуклеозидом не более 0,4 мкмоль/м². Этому условию, в частности, удовлетворяют широко используемые в настоящее время твердофазные носители на основе пористых стекол, модифицированных длинноцепочечными аминоалкильными «спейсерами» [44, 63, 64]. Характерно, что нам известна всего одна работа по использованию амидофосфитов (III) для синтеза на целлюлозных дисках [65]. Вероятно, трудности массообмена в целлюлозной матрице лишают фосфитный синтез основного преимущества — быстроты и усугубляют осложнения, связанные с побочными реакциями.

Побочные реакции могут играть заметную роль в уменьшении выхода на стадии конденсации. Например, показано, что гуанидин может фосфорилироваться по положению О(6) с образованием «ложных» цепей, которые в последующем подвергаются деградации при обработке водным аммиаком [54, 55, 66]:



Этот процесс может в значительной мере осложнить синтез и последующее выделение олигонуклеотидов с высоким содержанием гуанозина. Трудности можно обойти, если использовать амидофосфиты (III) — производные гуанозина с O(6) защищенным *n*-нитрофенилэтильной [54, 55] или β-цианэтильной группой [68]. В то же время имеются данные, что при введении по этому положению объемистой дифенилкарбамоильной группы скорость конденсации уменьшается из-за дополнительных стерических препятствий [67].

Продукт фосфорилирования по гетероциклу (IX) является достаточно реакционноспособным, чтобы быстро атаковаться некоторыми нуклеофилами. На этом основан ряд способов разложения соединения (IX) сразу после конденсации, до окисления в фосфат, что позволяет значительно улучшить возможность синтеза олигонуклеотидов с высоким содержанием гуанозина:

1) регенерация гуанозина водой или ацетат-ионом до окисления йодом; процесс регенерации протекает также в случае кэпирования смесью уксусный ангидрид — пиридин до окисления [68];

2) использование трифторацетата *N*-метиланилина в качестве активатора амидофосфитов (III) [68];

3) окисление раствором йода в смеси пиридин — уксусная кислота; при этом атака продукта (IX) ацетат-анионом происходит быстрее, чем окисление фосфита в фосфат [56].

Нестабильность растворов амидофосфитных производных гуанозина при хранении явилась предметом пристального изучения в работе [69]. Эта нестабильность создает определенные трудности при синтезе смешанных олигонуклеотидных зондов, поскольку смесь обедняется олигонуклеотидами с высоким содержанием гуанозина. При помощи спектроскопии ЯМР³¹P выяснено, что среди продуктов разложения амидофосфита (III) доминирует вещество с химсдвигом вторичного фосфита. Конкретный механизм процесса не выяснен, но есть основания предполагать, что в качестве промежуточных образуются и продукты фосфорилирования типа (IX). Авторы [69] отмечают также, что для амидофосфитов с β-цианэтильной группой (III), R' = CH₂CH₂CN, нестабильность производных гуанозина выражена слабее, чем для метильных аналогов (III), R' = CH₃.

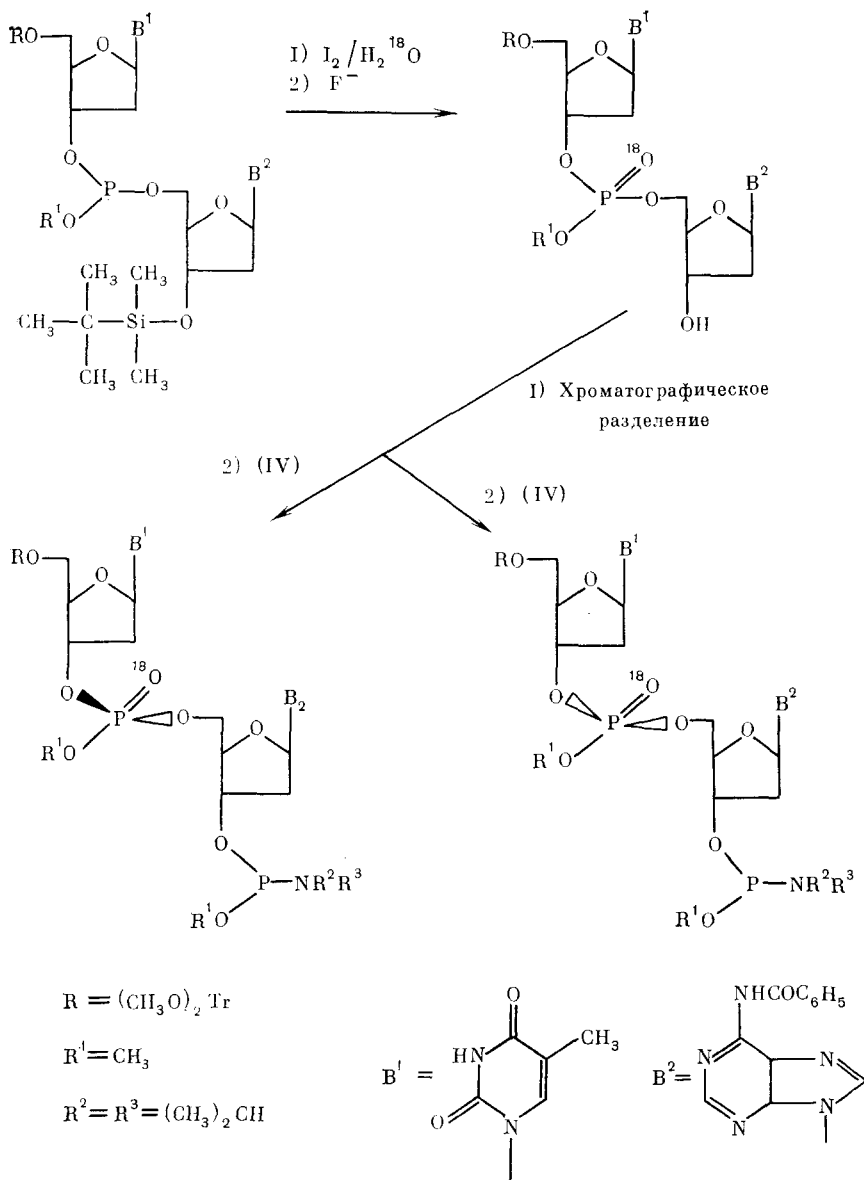
В случае амидофосфитов (III), R' = CH₃, возможно также метилирование тиминового гетероцикла [70], однако практическая значимость такой побочной реакции в реальных условиях твердофазного синтеза подвергается сомнению [5]. В целом влияние побочных реакций на синтез олигонуклеотидов хорошо иллюстрируется следующим примером: при клонировании протяженных продуктов автоматического амидофосфитного синтеза (60—90 оснований) в среднем в 40% клонов имеются замены оснований или делеции [71].

4. Окисление

Этот процесс традиционно осуществляют при помощи раствора йода в водно-органической среде. Реакция протекает быстро и однозначно, однако чередование водной обработки носителя, обладающего определенной сорбирующей способностью, с последующей конденсацией в «абсолютной» среде нельзя признать удачным. В ранней работе [6] в качестве окислителя использовали *m*-хлорнадбензойную кислоту в пиридине, однако такой окислитель быстро терял активность в процессе синтеза. В настоящее время для перевода фосфита в фосфат на твердой фазе предложены *бис*-триметилсилилперекись [72], в том числе с катализатором — триметилсилиловым эфиром надтрифторметансульфокислоты [73], периодат тетрабутиламмония [74] и иодозобензолдиацетат [74]. Последний интересен тем, что может быть использован непосредственно в кэпирующем растворе. Применительно к твердофазному синтезу новые реагенты находясь пока в стадии изучения, и их меньшая по сравнению с йодом доступность будет сдерживать массовую апробацию. В то же

время, учитывая богатый современный арсенал окислителей, можно ожидать появления новых работ в данном направлении. Перспективным представляется также использование раствора иода в смеси пиридин — уксусная кислота [56].

Стадия окисления или, в общем случае, переход от производных трехкоординированного фосфора к производным четырехкоординированного, имеет важное значение при синтезе олигомеров, модифицированных по межнуклеотидной связи. Показано, что при конденсации с участием амидофосфитов (III) получаются фосфиттриэфирные энантиомеры, соотношение которых зависит от условий реакции [45, 75, 76]. Если для окисления йодом брать $H_2^{18}O$, то получаются соответствующие изотопно хиральные фосфаты, что использовано для синтеза хиральных блоков [47]:



В дальнейшем оба этих блока использовались для синтеза олигонуклеотидов, отличающихся только конфигурацией одного из межнуклеотидных фосфатов.

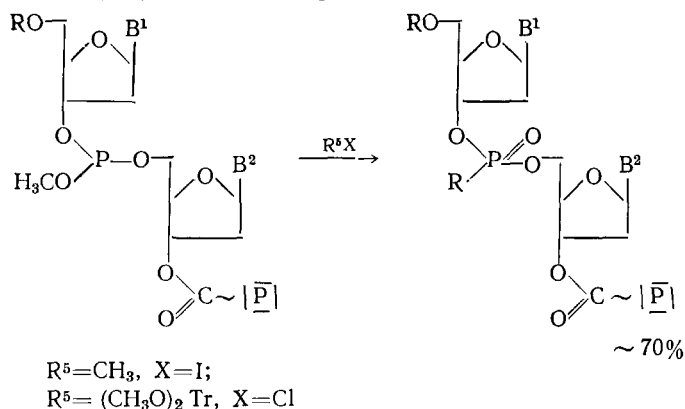
Фосфитный синтез весьма удобен для получения тионфосфатных аналогов олигонуклеотидов, часто используемых в качестве модельных со-

единений при изучении ферментов (из последних работ на тему использования этих аналогов см. [77] и ссылки в ней). В автоматизированном твердофазном методе Стеца и соавт. [78] тионфосфатную связь вводили на стадии «окисления», заменив водный иод на серу (0,4 М S_8 в лутидине, 60°, 15 мин). Полученные хиральные по тионфосфату олигомеры в большинстве случаев удавалось хроматографически разделить на отдельные энантиомеры.

Аналогично тионфосфатным в принципе можно получить и селенофосфатные аналоги, представляющие интерес для рентгеноструктурных исследований ДНК и изучения спин-спиновых взаимодействий ^{31}P — ^{77}Se . Однако авторам работ [78, 79] удалось получить только несколько ди- и тринуклеотидных аналогов (0,1 М $KSeCN$ в ацетонитриле, 60°, 1 ч), поскольку в процессе повторяющихся циклов со стадией окисления йодом происходит потеря селена по неизвестному разработчикам механизму.

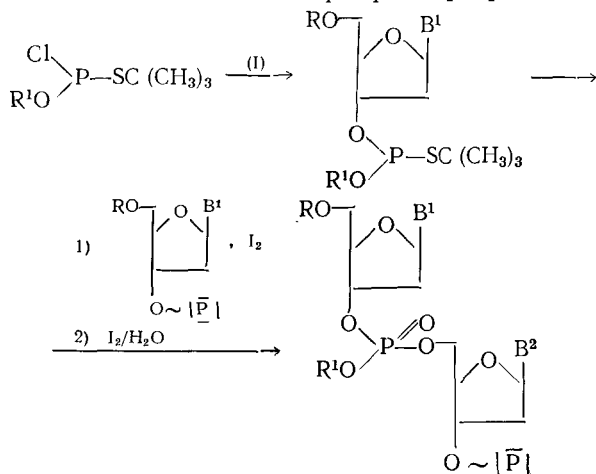
При взаимодействии триалкилфосфитных промежуточных соединений на твердой фазе со смесью I_2 /анилин/лутидин получено также несколько амидофосфатных аналогов ди- и тринуклеотидов, однако выход желаемых продуктов невелик (менее 20%) и методология нуждается в совершенствовании [79].

Модификацию межнуклеотидной связи можно осуществить и с использованием перегруппировки Арбузова [80]:



Полученные с использованием такого приема олигомеры, в которых одна или несколько межнуклеотидных группировок являются фосфонатными, также могут быть разделены на отдельные энантиомеры при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

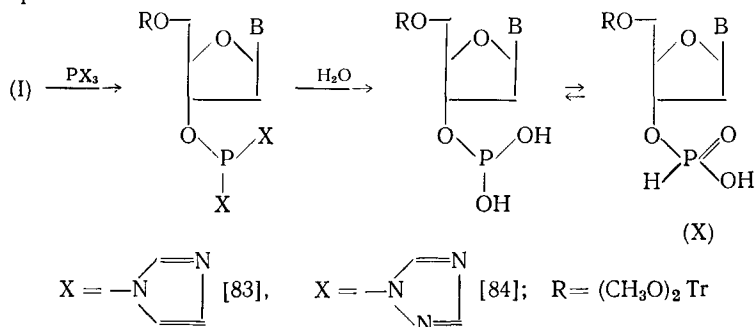
Предложен новый вариант фосфитного синтеза, позволяющий практически совместить стадии окисления и конденсации. Исходными мономерами в этом способе являются тиолфосфиты [81]:



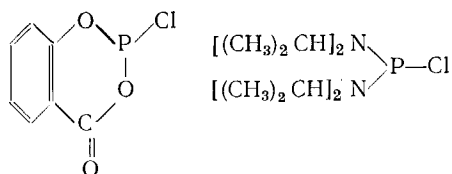
Конденсация осуществляется в присутствии иода в среде абсолютно-го растворителя, а дальнейшее окисление может быть достигнуто простым добавлением воды. Однако в ближайшем будущем вряд ли этот вариант составит конкуренцию хорошо отработанной амидофосфитной конденсации.

IV. НУКЛЕОЗИДФОСИТЫ В СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (ФОСФОНАТНЫЙ СИНТЕЗ)

В последнее время предложено использовать в качестве мономеров твердофазного синтеза нуклеозидфосфиты (X), в основном существующие в Н-фосфонатной форме. Сам же способ синтеза олигонуклеотидов получил название «фосфонатного» [82—85]. Предложенные пионерами твердофазного фосфонатного синтеза методы получения нуклеозидфосфитов (X) основаны на взаимодействии нуклеозидов (I) с *трис*(азолил)фосфинами:



Разумеется, для предотвращения образования ди- и триэфиров фосфористой кислоты такие фосфорилирующие агенты брали в многократном избытке. Позднее опубликовано сообщение о применении других фосфорилирующих агентов [86]:

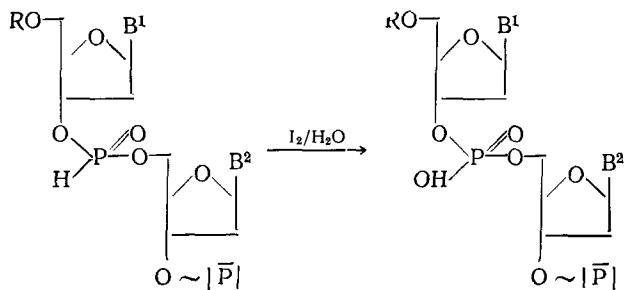


Использование таких агентов позволяет уменьшить вероятность образования побочных соединений по сравнению с *трис*(азолил)фосфинами. Во всех случаях [82—86] полученные в результате фосфорилирования и последующего гидролиза мономеры (X) очищали при помощи адсорбционной или обращенно-фазовой хроматографии на колонке. В виде солей с третичными аминами нуклеозидфосфиты (X) достаточно устойчивы и могут храниться достаточно долго.

Показано, что активаторами мономеров (X) при синтезе олигонуклеотидов могут служить различные ангидриды и хлорангидриды кислот фосфора, карбоновых и сульфоновых кислот, но наилучшим среди перепробованных агентов оказался хлорангидрид пивалиновой кислоты [84, 85]. Предполагается, что активным фосфорилирующим соединением в этом случае является смешанный ангидрид фосфористой и карбоновой кислот. Имеются подозрения, что предварительное смешение нуклеозидфосфита (X) и пивалоилхлорида приводит к образованию бифункционального фосфорилирующего агента — диацилнуклеозидфосфита. Поэтому предлагается смешивать реагенты непосредственно в процессе конденсации, в реакторе [85].

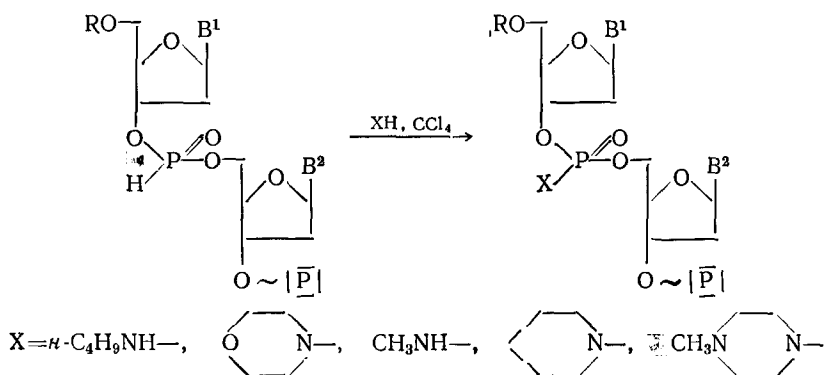
Отдельная стадия экпирования в фосфонатном синтезе, видимо, не требуется, поскольку нефосфорилированные оксигруппы на носителе должны в процессе конденсации ацилироваться. Благодаря пятикратному избытку конденсирующего агента (пивалоилхлорида) по отношению к мономеру (X) фосфонатный метод не требует такого перерасхода ну-

клеотидного компонента, как амидофосфитный. Межнуклеотидные фосфитдиэфирные группировки, образующиеся в процессе синтеза, достаточно химически инертны и не нуждаются в защите. Их окисляют раствором иода в водно-органической среде по окончании синтеза олигомера:

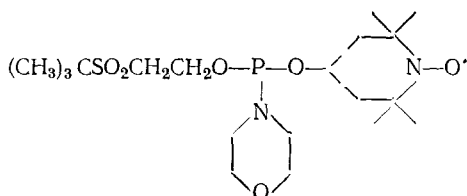


Однако процесс окисления протекает медленнее, чем в случае триалкилфосфитов, и для его успешного завершения требуется катализ более сильными органическими основаниями, чем пиридин [84]. Таким образом, цикл наращивания цепи в фосфонатном синтезе состоит фактически из стадий конденсации (1—2 мин), детритилирования (1—2 мин) и промывок, что позволяет быстро синтезировать весьма протяженные олигонуклеотиды, содержащие до 100 оснований [84]. На данный момент имеются некоторые неясности и подозрения, например, о возможности частичного детритилирования в процессе конденсации [84] или неполном экпировании. Однако фосфонатный метод исключительно прост и экономичен, и, несомненно, в самое ближайшее время завоюет множество сторонников.

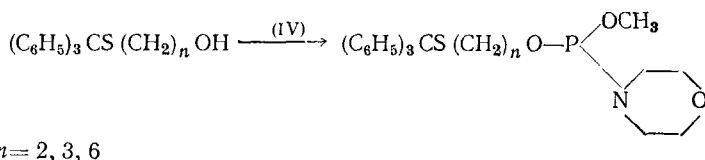
Этот метод перспективен и в синтезе аналогов олигонуклеотидов. К сожалению, сама фосфитдиэфирная группировка неустойчива к действию оснований, и неокисленный олигомер с фосфитдиэфирными межнуклеотидными группами не может быть снят с носителя обычными методами. Однако эта группировка может подвергаться атаке нуклеофилом, например в условиях реакции Атертона — Тодда. Это обстоятельство использовано Грязновым и соавт. [87] при синтезе динуклеотидов с фосфамидной межнуклеотидной связью. Приложение этой же реакции к олигомерному продукту фосфонатного синтеза на твердой фазе позволило получить ряд амидофосфатных аналогов олигонуклеотидов [88]:



В этой же работе [88] сообщается о синтезе девяти аналогов ундекатимидилата, отличающихся количеством морфолидофосфатных межнуклеотидных группировок, а также упоминается о возможности получения тионфосфатных (0,1 М S_8 в смеси триэтиламин — сероуглерод, 1:9, 5 мин) и триэфирных (10%-ный спирт в смеси N-метилимидазол — триэтиламин — четыреххлористый углерод, 5:5:90) аналогов олигонуклеотидов через фосфитдиэфиры на носителе.

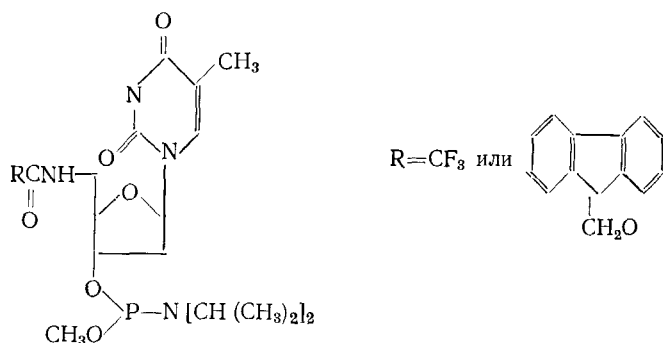


Однако чаще репортерные группы, например, окрашенные или флуоресцирующие хромофоры, имеют сложное строение. Их проще вводить в более мягких условиях в олигонуклеотиды, предварительно модифицированные какими-либо функциональными группами. Авторы работ по 5'-фосфорилированию с использованием амидофосфитов [89—91] отмечают, что использование фосфитных агентов позволяет ввести 5'-концевой тионфосфат — потенциальную акцепторную группу для различных модификаторов. Для введения тиольной группы использовали морфолидофосфит с тритильной защитой [93]:



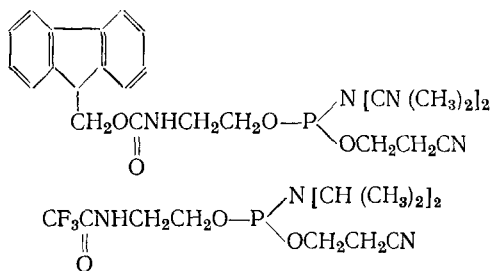
После фосфорилирования олигонуклеотида и окисления иодом тритильную группу удаляли нитратом серебра.

Введение аминогруппы осуществляли с использованием амидофосфитных производных 5'-дезоксип-5'-аминотимидина [94]:



Щелочелабильные группы — флуоренилметоксикарбонильная или трифторацетильная удалялись в процессе обработки носителя аммиаком. Полученные таким образом олигомеры с аминогруппами использовались при синтезе праймеров для секвенирования по методу Сэнгера, флуоресцентно меченых по 5'-концу [94].

Флуоренилметоксикарбонильная [95] и трифторацетильная [96] группы использованы также в конструкциях других фосфорилирующих агентов для введения аминогруппы:



В последнем случае для увеличения выхода целевых олигонуклеотидов защитные группы удаляли не аммиаком, а диазабициклоундеценем [96].



Совершенствование методов нуклеофильного катализа в настоящее время позволяет осуществлять и фосфотриэфирную конденсацию достаточно быстро и эффективно [67, 97—101]. Однако коммерческое производство нуклеозидамидофосфитов и автоматических синтезаторов, работающих по амидофосфитному циклу, приобрело поистине массовый характер. Фосфонатный синтез также быстро ставится на коммерческую основу. Операции синтетического цикла постоянно совершенствуются и упрощаются, делая процедуру химического синтеза ДНК стремительной и элегантной. Потребность в модифицированных олигонуклеотидах также способствует возрастающему вниманию как к нуклеозидфосфитам, так и к фундаментальным вопросам химии фосфорорганических соединений, гарантируя фосфитному синтезу дальнейшее развитие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sturdik E., Basnak I. // *Biologia* (Bratislava). 1984. V. 39. P. 435.
2. Алексеев К. С., Иванов И. Г. // *Успехи мол. биол.* (София). 1985. Т. 4. С. 3.
3. Серебряный С. Б. // *Укр. хим. журн.* 1985. Т. 51. С. 418.
4. Thuong N. T., Asseline U. // *Biochimie*. 1985. V. 67. P. 673.
5. Caruthers M. H. // *Science*. 1985. V. 230. P. 281.
6. Tanaka T., Letsinger R. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. P. 3249.
7. Alvarado-Urbina G., Sathe G. M., Liu W.-C. et al. // *Science*. 1981. V. 214. P. 270.
8. Matteucci M. D., Caruthers M. H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. P. 3185.
9. Letsinger R. L., Groody E. P., Lander N., Tanaka T. // *Tetrahedron*. 1984. V. 40. P. 137.
10. Beaucage S. L., Caruthers M. H. // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. P. 1859.
11. McBride L. G., Caruthers M. H. // *Ibid.* 1983. V. 24. P. 245.
12. Sinha N. D., Biernat J., Koster H. // *Ibid.* 1983. V. 24. P. 5843.
13. Claesen C., Tesser G. I., Dreef C. E. et al. // *Ibid.* 1984. V. 25. P. 1307.
14. Schwarz M. H., Pfeleiderer W. // *Ibid.* 1984. V. 25. P. 5513.
15. Koster H., Biernat J., McManus J. et al. // *Tetrahedron*. 1984. V. 40. P. 103.
16. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Koster H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 4539.
17. Dorper T., Wihnacker E.-L. // *Ibid.* 1983. V. 11. P. 2575.
18. Seela F., Kaiser K. // *Ibid.* 1986. V. 14. P. 1825.
19. Bruzik K. S. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986. P. 329.
20. Fourrey J. L., Varenne J. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 1963.
21. Fourrey J. L., Varenne J. // *Ibid.* 1984. V. 25. P. 4511.
22. Fourrey J. L., Varenne J. // *Ibid.* 1985. V. 26. P. 2663.
23. Balgobin N., Chattopadhyaya J. // *Acta Chem. Scand.* 1985. V. B39. P. 883.
24. Guy A., Molko D., Teoule R., Wagrez L. // *Helv. Chim. acta*. 1986. V. 69. P. 1034.
25. Карпышев Н. Н., Ястребов С. И., Понов С. Г. // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. С. 1361.
26. Нифантьев Э. Г., Борисов Е. В. // *Журн. орган. химии*. 1985. Т. 55. С. 1660.
27. Beaucage S. L. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 375.
28. Moore M. E., Beaucage S. L. // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50. P. 2019.
29. Barone A. D., Tang J.-T., Caruthers M. H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 4051.
30. Nielsen J., Taagaard M., Van Boom J. H., Dahl O. // *Ibid.* 1986. V. 14. P. 7391.
31. Jayaraman K., McClaugherty H. // *Tetrahedron Lett.* 1982. V. 23. P. 5377.
32. Cao T. M., Bingham S. E., Sung M. T. // *Ibid.* 1983. V. 24. P. 1019.
33. Lee H.-J., Moon S.-H. // *Chem. Lett.* 1986. P. 1229.
34. Hamamoto S., Takaku H. // *Ibid.* 1986. P. 1401.
35. Toren P. C., Betsh D. F., Weit L. H., Coull J. M. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 152. P. 291.
36. Josephson S., Lagerholm E., Palm G. // *Acta Chem. Scand.* 1984. V. B38. P. 539.
37. Карпышев Н. Н., Данилюк Н. К., Понов С. Г. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. С. 365.
38. Froehler B. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 3171.
39. Seliger H., Scalfi C., Eisenbeiss F. // *Ibid.* 1983. V. 24. P. 4963.
40. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 661.
41. Hering G., Stocklein-Schneiderwind R., Ugi I. et al. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1985. V. 4. P. 169.
42. Seliger H., Gupta K. // *Ibid.* 1985. V. 4. P. 169.
43. Ogilvie K. K., Thierault N., Sadana K. L. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 7741.
44. Kumar G., Poonian M. S. // *J. Org. Chem.* 1984. V. 49. P. 4905.
45. Bannwarth W. // *Helv. Chim. acta*. 1985. V. 68. P. 1907.
46. Dorman M. A., Noble S. A., McBride L., Caruthers M. H. // *Tetrahedron*, 1984. V. 40. P. 95.

47. Herdering W., Keine A., Seela F.//*Helv. Chim. acta*. 1985. V. 68. P. 2119.
48. Wolter A., Biernat J., Koster H.//*Nucleosides and Nucleotides*. 1986. V. 5. P. 67.
49. Чернов Б. К., Голова Ю. Б., Помозова Б. Е., Баев А. А.//*Докл. АН СССР*. 1986. Т. 291. С. 1131.
50. Shaller H., Khorana H. G.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 3828.
51. Буткус В. В., Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н.//*Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. С. 1518.
52. Efcauitch J., Heiner C.//*Nucleosides and Nucleotides*. 1985. V. 4. P. 267.
53. Becker C. R.//*J. Chromatogr.* 1985. V. 236. P. 293.
54. Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K.//*Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 2525.
55. Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K.//*Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. P. 6447.
56. Грязнов С. М., Потапов В. К., Метелев В. Г. и др.//*Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 988.
57. Usman N., Pon R. T., Ogilvie K. K.//*Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 4567.
58. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F.//*Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 6369.
59. Fisher E. F., Caruthers M. H.//*Ibid.* 1983. V. 11. P. 1589.
60. Sproat B. S., Gait M. J.//*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*/Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 83.
61. Seliger H., Kotshi U.//*Nucleosides and Nucleotides*. 1985. V. 4. P. 153.
62. Карнышев Н. Н., Артамонова Т. П., Попов С. Г.//*Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 1063.
63. Minganti C., Ganesh K. N., Sproat B. S., Gait M. J.//*Anal. Biochem.* 1985. V. 147. P. 63.
64. Marugg J. E., Piel N., McLaughlin L. W. et al.//*Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 8639.
65. Ott J., Eckstein F.//*Ibid.* 1984. V. 12. P. 9137.
66. Caruthers M. H., McBride L. J., Bracco L. P., Dubendorff J. W.//*Nucleosides and Nucleotides*. 1985. V. 4. P. 95.
67. Sproat B. S., Rider P., Beiler B.//*Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 1811.
68. Pon R. T., Usman N., Damha M. J., Ogilvie K. K.//*Ibid.* 1986. V. 14. P. 6453.
69. Zon G., Gallo K. A., Samson C. J. et al.//*Ibid.* 1985. V. 13. P. 8181.
70. Gao X., Gaffney B. L., Senior M. et al.//*Ibid.* 1985. V. 13. P. 573.
71. McClain W. H., Foss K., Mittelstadt K. L., Schneider J.//*Ibid.* 1986. V. 14. P. 6770.
72. Wozniak L., Kovalski J.//*Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 4965.
73. Hayakawa Y., Uchiama N., Noyori R.//*XIII Symp. Nucl. Acids Chem. Osaka — Oxford — Washington*, 1985. P. 145; *РЖФиз-хим. биол. биотехнол.* 1986. 6A306.
74. Fourrey J. L., Varenne J.//*Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 1217.
75. Stec W. J., Zon G.//*Ibid.* 1984. V. 25. P. 5279.
76. Seela F., Ott J., Potter B. V. L., Herdering W.//*Nucleosides and Nucleotides*, 1985. V. 4. P. 131.
77. Nakamaye K. L., Eckstein F.//*Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 9697.
78. Stec W. J., Zon G., Egan W., Stec B.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 6077.
79. Koziolkiewicz M., Uznanski B., Stec B.//*Chem. scr.* 1986. V. 26. P. 251.
80. Stec W. J., Zon G.//*J. Chromatogr.* 1985. V. 326. P. 263.
81. Fujii M., Nagai N., Sekine M., Hata T.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 3832.
82. Froehler B. C., Matteucci M. D.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 469.
83. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.//*Chem. scr.*, 1986. V. 26. P. 59.
84. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.//*Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 5399.
85. Garegg P. J., Regbert T., Stawinski J., Stromberg R.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 4051.
86. Marugg J. E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E. et al.//*Ibid.* 1986. V. 27. P. 2661.
87. Грязнов С. М., Соколова Н. И., Шабарова З. А.//*Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*, 1986. Т. 27. С. 421.
88. Froehler B. C.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 5575.
89. Uhlmann E., Engels J.//*Ibid.* 1986. V. 27. P. 1023.
90. Uhlmann E., Engels J.//*Chem. scr.* 1986. V. 26. P. 217.
91. Horn T., Urdea M. S.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 4705.
92. Claesen C. A. A., Daemen C. J. M., Tesser G. J.//*Recl. trav. chim. Pays-Bas*. 1986. V. 105. P. 116.
93. Connolly B. A.//*Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. P. 4485.
94. Smith L. M., Fung S., Hunkapiller M. W. et al.//*Ibid.* 1985. V. 13. P. 2399.
95. Agrawal S., Christodoulou C., Gait M. J.//*Ibid.* 1986. V. 14. P. 6227.
96. Coull J. M., Lee W. H., Bischoff R.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 3991.
97. Ефимов В. А., Чакхмахчьева О. Г.//*Биохимия*. 1985. V. 67. P. 791.
98. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Дубей И. Я. et al.//*Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 6525.
99. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Горбунов Ю. А. и др.//*Химия природ. соединений*. 1986. С. 386.
100. Сияков А. Н., Лебедев А. В.//*Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 1129.
101. Devine K. G., Reese C. B.//*Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 5529.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.