

Рис. 1

Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ соединений (II): $B^1 = B^2 = \text{Thy}$, $R^1 = (\text{MeO})_2\text{Tr}$, $R^2 = \text{Me}$ (a), $B^1 = B^2 = \text{Thy}$, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$ (б), $B^1 = B^2 = \text{Thy}$, $R^1 = R^2 = \text{H}$ (в). Носитель — Нуперсил ODS, 5 мкм; скорость элюции 1 мл/мин. Колонка $4,6 \times 250$ мм

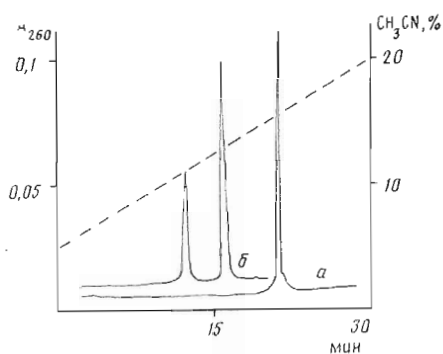


Рис. 2

Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ пентадекануклеотида (IV), выделенного электрофорезом в ПААГ (a), продуктов ацидолиза пентадекануклеотида (IV) 15% уксусной кислотой, 90° С, 5 мин [14] (б). Условия см. рис. 1

что согласуется с результатами работы [10] о каталитическом эффекте пиридина в реакции Аттертона — Тодда. Физико-химические характеристики фосфамидов (II), синтезированных в пиридине, полностью совпали с характеристиками этих соединений, полученных в диметилформамиде (рис. 1).

В работе была определена устойчивость межнуклеотидной фосфамидной группы соединения (II) в условиях твердофазного синтеза олигонуклеотидов по фосфитамидной и гидрофосфорильной схемам. Известно, что фосфамиды кислотолабильны [6—8]. Поэтому было необходимо определить устойчивость фосфамидной связи в фосфодиазиранидной группе по отношению к протонным детритилирующим агентам, широко применяемым для постадийного детритилирования. В связи с этим был получен динуклеотид (II, $B^1 = B^2 = \text{Thy}$, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$), который обрабатывали 30 мин 0,9% раствором трифторуксусной кислоты или 3% дихлоруксусной кислоты в хлористом метиле. Методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и ТСХ было показано, что фосфодиазиранидная группа этого соединения устойчива в указанных условиях ацидолиза. Эта устойчивость, вероятно, связана с неэффективным протонированием атома азота, что обусловлено $n_{\text{N}} \rightarrow \pi_{\text{P}=\text{O}}$ -сопряжением свободной пары электронов атома азота с фосфорильной группой [11]. Такое сопряжение крайне затруднено для фосфомоноэфирамидов, что и вызывает их значительно большую кислотолабильность по сравнению с фосфодиазиранидами. Аналогичным образом было показано, что эта группа также устойчива по отношению к окисляющему и кепирующему реагентам, применяемым в синтетическом цикле [12].

Затем динуклеозид (II, $B^1 = B^2 = \text{Thy}$, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$) был превращен в фосфитамидный (I) и гидрофосфорильный (III) компоненты, которые были использованы для синтеза пентадекануклеотидов, содержащих фосфамидные связи, по фосфитамидной [12] и гидрофосфорильной [13] схемам: $5' \text{ TTGSSAAT}_{\text{PN}} \text{ TG GCTT}$, $\text{AAGSSAAT}_{\text{PN}} \text{ TG GCAA}$ (IV), $\text{TTGSSAAT}_{\text{PN}} \text{ TTG GCTT}$. Эффективность образования связи между нуклеотидным компонентом (I) и нуклеозидным компонентом, находящимся на полимерном носителе, составляет 95—97%, а для компонента (III) — 90—95%. По окончании наращивания нуклеотидной цепи олигонуклеотиды были деблокированы и выделены электрофорезом в ПААГ. Гомогенность пентадекануклеотидов была подтверждена обращенно-фазовой ВЭЖХ. Наличие фосфомоноэфирамидной межнуклеотидной связи в олигонуклеотидах подтверждали селективным кислотным гидролизом 15%

уксусной кислотой [14] (рис. 2). Синтезированные пентадекануклеотиды содержат участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *Bgl*I и в настоящее время используются для изучения взаимодействия этого фермента с модифицированными фрагментами ДНК.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что синтезированные по реакции Аттертона — Тодда фосфамиды могут быть региоселективно и эффективно введены в олигонуклеотидную цепь, наращиваемую по фосфитамидной или гидрофосфорильной схемам.

Авторы выражают благодарность С. А. Филипову (ИБХ АН СССР) за помощь, оказанную в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Froehler B. C., Ng P., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4831—4839
2. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова А. Н., Сиволобова Г. Ф. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 289—291.
3. Карпейский М. Я., Сенченко В. Б., Яковлев Г. И., Колбановская Е. Ю. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 3. С. 386—395.
4. Громова Е. С., Виноградова М. Н., Упорова Т. М., Грязнова О. И., Исагулянц М. Г., Косых В. Г., Никольская Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 269—271.
5. Letsinger R. L., Wilkes J. S., Dumas L. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 292—293.
6. Mungll W. S., Greene G. L., Heavner G. A., Letsinger R. L. // J. Org. Chem. 1975. V. 40. P. 1659—1662.
7. Hata T. // Proceedings of the International Conference in Poznan. 13—17.09.1976. P. 346—350.
8. Горкун А. Ф., Вейко В. П., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 275. № 1. С. 94—96.
9. Грязнов С. М., Соколова Н. М., Шабарова З. А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1986. Т. 27. № 4. С. 421—424.
10. Левина А. С., Иванова Е. М. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 231—238.
11. Tomasz J., Bottka S. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 3. P. 295—306.
12. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.
13. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
14. Долинина Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 775—763.

Поступило в редакцию
13.1.1989

SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING PHOSPHORAMIDE INTERNUCLEOTIDE BONDS WITH THE USE OF ATTERTON — TODD REACTION

GRYAZNOV S. M., AZHAEV A. V.

All-Union Institute of Biotechnology, Moscow

New and efficient method of preparing modified oligodeoxyribonucleotides containing phosphoramidate internucleotide bonds, based on Atterton — Todd reaction, has been developed.