



УДК 547.963.32

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКЦИОННОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИСЗАМЕЩЕННЫХ ПО КОНЦЕВОМУ ФОСФАТУ ДЕЗОКСИДИНУКЛЕОТИДОВ *

*Мишенни Г. Ф., Самуков В. В., Семенова Л. Н.,
Шубина Т. Н.*

*Новосибирский институт органической химии СО
Академии наук СССР*

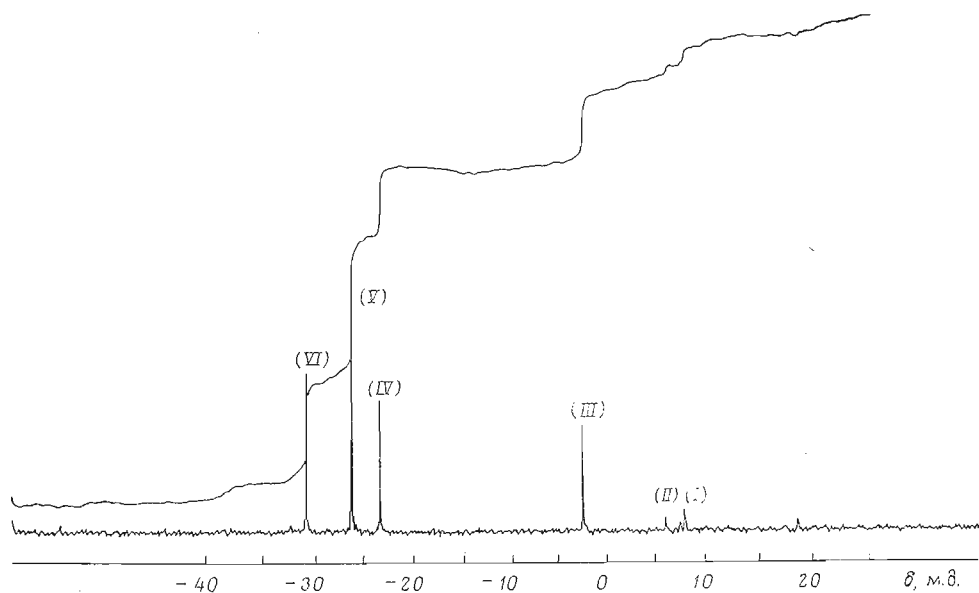
Для выделения из реакционной смеси бисзамещенных по концевому фосфату дезоксидинуклеотидов на примере 5'-дианилидов использован экстракционный метод. Исходные 5'-дианилиды N-ацилдезоксимононуклеотидов получены при использовании в качестве конденсирующего агента смеси трифенилфосфин — CCl_4 (1 : 1) и выделены хроматографией на силикагеле с выходом 55—70%. Для синтеза межинуклеотидной связи использован мезитилсульфотриазолид или триизопропилбензолсульфохлорид. С выходом 50—70% выделены и охарактеризованы 10 защищенных динуклеотидов.

Динуклеотидные блоки являются основным строительным материалом при синтезе олигонуклеотидов диэфирным методом. Наиболее распространенным считается цианоэтильный метод получения динуклеотидов, связанный с выделением целевых продуктов ионообменной хроматографией [1, 2]. Известен также экстракционный способ выделения из реакционных смесей дезоксидинуклеотидов, монозамещенных по концевому фосфату липофильной *n*-(трифенилметил)алилидной группой [3]. Однако описанный способ выделения дезоксидинуклеотидов с таким заместителем на 5'-концевой фосфатной группе трудновоспроизводим [4]. Кроме того, при использовании в качестве конденсирующих агентов ароматических сульфонилхлоридов в значительной степени протекает побочная реакция сульфонилирования азота фосфамидной группы, что делает невозможным ее количественное удаление [3]. Описанная в работе [5] N-тримил-*n*-аминофенильная защитная группа оказалась удобной для экстракционного выделения ди- и тридезокситимидилатов, однако пока не показана универсальность предложенной методики.

Настоящая статья посвящена разработке удобного препаративного способа выделения из реакционных смесей бисзамещенных по 5'-концевому фосфату дезоксидинуклеотидов на примере использования анилидных защитных групп, превращающих концевой фосфат в незаряженную группу.

Для получения 5'-дианилидов N-ацилдезоксимононуклеотидов в качестве конденсирующего агента использовали смесь трифенилфосфина с CCl_4 (1 : 1), успешно зарекомендовавшую себя в синтезе производных фосфорной кислоты, в частности диамидатов [6]. По данным спектров ^{31}P -ЯМР

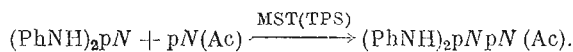
* Символ d для краткости в схеме и таблицах опущен.



Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси при синтезе $(\text{PhNH})_2\text{pT}$ (0,2 ммоль pT, 2 ммоль анилина, 1 ммоль $\text{Ph}_3\text{P} - \text{CCl}_4$ в пиридине, 2 ч, 25°). В скобках приведены δ , м. д.: (I) — $\text{O}[\text{p}(\text{PhNH})\text{T}]_2$ (7,4—8,0); (II) — Ph_3P (5,9); (III) — $(\text{PhNH})_2\text{pT}$ (—2,5); (IV) — $(\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Cl})^+\text{Cl}^-$ (—23,4); (V) — Ph_3PO (—26,3); (VI) — $(\text{Ph}_3\text{P}^+\text{NHPH})\text{Cl}^-$ (—31)

(рисунок), основным продуктом превращения нуклеотида при действии анилина и $\text{Ph}_3\text{P} - \text{CCl}_4$ в пиридине является нуклеозид-5'-дианилидофосфат (III) (80—85%). При этом наблюдается также образование симметричного динуклеозиддианилидпирофосфата (I) (15—20%). Остальные сигналы в спектре ЯМР относятся к продуктам превращения трифенилфосфина [7]. Побочная реакция анилина с $\text{Ph}_3\text{P} - \text{CCl}_4$, приводящая к образованию соли аминофосфония (VI), идет в этих условиях достаточно медленно и не влияет на выход 5'-дианилида дезоксирибонуклеотида. По сравнению с парой трифенилфосфин — 2,2'-дипиридилдисульфид, предложенной ранее для получения 5'-дианилидов [8], примененный нами конденсирующий агент значительно сокращает время реакции (2 ч, а не 2—3 сут), обеспечивает хорошую воспроизводимость методики по всем четырем дезокси-нуклеотидам и достаточно высокий выход целевых продуктов, легко выделяемых хроматографией на силикагеле. Синтезированные 5'-дианилиды N-ацилдезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1.

Синтез динуклеотидов проводили по схеме



Для конденсации использовали мезитиленсульфотриазолид (MST) или триизопропилбензолсульфохлорид (TPS).

Защищенные динуклеотиды выделяли из реакционной смеси экстракцией по аналогии с работой [9].

Защищенные динуклеотидные блоки, выделенные экстракционным методом, могут быть использованы в качестве нуклеозидного или нуклеотидного компонента после удаления одной из концевых защитных групп. Деблокирование концевого фосфата не представляет затруднений и при использовании свежеперегнанного изоамилнитрита протекает количественно [10]. Характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 2.

Разработанная методика позволяет выделять бисзамещенные по концевому фосфату дезоксидинуклеотиды экстракцией аналогично тритилированным дезоксидинуклеозидмонофосфатам, что, несомненно, упрощает

Таблица 1

Синтезированные 5'-дианилиды N-ацилдезоксимоно-
нуклеотидов

Дианилид	Выход, %	УФ-спектр *		R _f в системе	
		λ _{макс} , нм	λ _{мин} , нм	А	Б
(PhNH) ₂ PT	70	270	250	0,43	0,62
(PhNH) ₂ panC	70	225, 288	248	0,54	0,84
(PhNH) ₂ pbzA	60	280	250–255, плато	0,25	0,46
(PhNH) ₂ pibG	55	230, 265	250	0,12	0,32

* УФ-спектры снимали в 96% этаноле.

Таблица 2

5'-Дианилиды N-ацилдезоксидинуклеотидов

Наименование динуклеотида	Исходные вещества, ммоль			Время реакции	Выход, %	Кот-во примесей по D ₂₆₀ , %	R _f в системе		D ₂₄₀ /D ₂₆₀ до (1) и после (2) удаления дианилидной защитной группы	
	(PhNH) ₂ pN	pNac	конденсиру- ющий агент				В	Г	1	2
(PhNH) ₂ pbzApT(Ac)	2,4	4,1	12,3 (MST)	4 сут	50	—	0,58	0,46	1,03	0,58
(PhNH) ₂ pbzApibG(iB)	2	3	10 (MST)	4 сут	66	2	0,60	0,42	1,0	0,55
(PhNH) ₂ pibGpbzA(Ac) *	1,71	3,0	10 (MST)	2 сут	50	5	0,54	0,23	1,02	0,56
(PhNH) ₂ pibGpT(Ac)	0,92	1,38	4,9 (MST)	3 сут	52	—	0,56	0,22	1,05	0,35
(PhNH) ₂ panCpibG(iB)	1,58	2,4	5,06 (TPS)	4,5 ч	73	6	0,67	0,40	1,08	0,47
(PhNH) ₂ pTpT(Ac) **										
(PhNH) ₂ pTpanC(Ac)	1	1,5	4,5 (MST)	3 сут	62	5	0,65	0,25	0,92	0,54
(PhNH) ₂ pbzApbzA(Ac)	0,6	0,9	2,7 (MST)	3 сут	63	—	0,63	0,28	1,10	0,70
(PhNH) ₂ pibGpibG(iB)	1,84	2,76	5,5 (TPS)	5 ч	65	—	0,92	0,40	1,20	0,40
(PhNH) ₂ panCpanC(Ac)	2	3	6 (TPS)	5 ч	95		0,89	0,50	1,10	0,63

* Продукт экстрагировали смесью этилацетат — n-бутанол (4 : 1 по объему).

** Соединение описано нами в работе [11].

процесс получения целевых динуклеотидов и делает его более технологичным. Использование 5'-дианилидов дезоксидинуклеотидов в качестве нуклеозидного компонента в олигонуклеотидном синтезе гарантирует стабильность Р-защиты растущей последовательности на протяжении всего синтеза, что подтверждается литературными данными [11, 12], а также данными, полученными в нашей лаборатории.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-дезоксимононуклеотиды производства СКТБ БАВ Главмикробиопрома, трифенилфосфин (Chemapol, Чехословакия), силикагель (Merck, ФРГ) или ОХЦ НИОХ (фракция 0,145–0,315). Мезитилсульфотриазолид получали по методике работы [13]. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F 254 (Merck) в системах: CHCl₃—CH₃OH, 9 : 1 (А); CHCl₃—CH₃OH, 4 : 1 (Б); CH₃CN—H₂O, 4 : 1 (В); CH₃CN—H₂O, 9 : 1 (Г). УФ-спектры снимали на приборе «Specord» (ГДР), спектры ³¹P-ЯМР — на спектрометре WP-80 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 32,40 МГц. Химические сдвиги приведены относительно внешнего стандарта H₃PO₄. Диаметр ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,2 мл. МКХ проводили на DEAE-целлюлозе в градиенте концентраций NaCl в 0,01 М трис-HCl-буфере, содержащем 7 М мочевины (pH 7,5).

Общая методика синтеза 5'-дианилидов N-ацилдезоксимононуклеотидов. К раствору 5 ммоль N-ацилдезоксимононуклеотида и 25 ммоль Ph_3P в 15—20 мл абс. пиридина добавляли 50 ммоль анилина и 25 ммоль CCl_4 . Через 2 ч к реакционной смеси добавляли 30 мл воды, упаривали в вакууме и удаляли пиридин азеотропной отгонкой с бензолом. Остаток растворяли в 100 мл хлороформа и промывали водой (3×20 мл). Хлороформный раствор упаривали, остаток высушивали отгонкой с бензолом, растворяли в 30—40 мл хлороформа и наносили на колошку (22×5 см) с силикагелем, уравновешенную хлороформом. Колонку промывали 500 мл хлороформа, а затем смесью хлороформ — этиловый спирт (9 : 1). Фракции, соответствующие дианилиду N-ацилдезоксимононуклеотида по данным ТСХ в системах А или Б, собирали (общий объем элюата равен примерно 3 объемам колонки), промывали водой ($3 \times \frac{1}{6}$ объема элюата). Органический слой упаривали, высушивали азеотропной отгонкой с бензолом, остаток растворяли в 10—12 мл хлороформа и осаждали петролейным эфиром (200 мл). Выход и характеристики синтезированных продуктов приведены в табл. 1.

Общая методика синтеза 5'-дианилидов N-ацилдезоксидинуклеотидов. Способ 1. Смесь 1 ммоль 5'-дианилида N-ацилдезоксимононуклеотида и 1,5 ммоль N, O-ацелированного дезоксимононуклеотида высушивали упариванием с абс. пиридином (3×10 мл). Остаток растворяли в 10 мл абс. пиридина и добавляли 4,5—5 ммоль мезитиленсульфотриазолида. Через 2—4 сут к реакционной смеси добавляли 15—20 мл воды и оставляли на 20 ч. Выпавший осадок мезитиленсульфокислоты отфильтровывали, фильтрат упаривали, удаляли пиридин азеотропной отгонкой с водой. К остатку добавляли 40—50 мл 0,2 М триэтиламмонийбикарбоната (ТЕАВ) и экстрагировали этилацетатом (5×15 мл). Затем водный слой экстрагировали смесью (4×15 мл) этилацетат — *n*-бутанол (7 : 3), органический слой промывали 10 мл 0,2 М ТЕАВ, упаривали, остаток высушивали отгонкой с абс. пиридином, растворяли в пиридине и осаждали в эфир. Выходы синтезированных 5'-дианилидов N-ацилдезоксидинуклеотидов и их характеристики приведены в табл. 2. По данным МКХ до и после удаления дианилидной защитной группы [10], синтезированные соединения гомогенны. По данным ТСХ в системе В, количество УФ-поглощающих примесей по D_{280} в полученных продуктах не превышает 10% (УФ-спектры записывали в 50% водном этаноле).

Способ 2. Смесь 1 ммоль 5'-дианилида N-ацилдезоксимононуклеотида и 1,5 ммоль N, O-ацелированного дезоксимононуклеотида высушивали упариванием с абс. пиридином (3×10 мл) или выдерживали в течение ночи в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Приливали 10 мл абс. пиридина, добавляли 3 ммоль триизопропилбензолсульфохлорида и оставляли на 4—5 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 6 мл 1 М раствора триэтиламина в пиридине и 10 мл воды. Через 16—18 ч смесь упаривали, удаляли пиридин азеотропной отгонкой с водой, остаток растворяли в 40 мл 0,2 М ТЕАВ и проводили экстракцию, как описано в способе 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре Д. Г., Левина А. С., Шубина Т. Н. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, 118—127.
2. Weimann O., Schaller H., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 83, 159—168.
3. Agarwal K. L., Jamazaki A., Khorana H. G. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2754—2762.
4. Köster H. (1974) in Recent developments in oligonucleotide synthesis and chemistry of minor bases of tRNA. International conference. September 13 and 14, 1974, p. 125, Poznan-Kiekrz, Poland.
5. Ohtsuka E., Morioka S., Ikehara M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 8437—8440.
6. Appel R., Einig H. (1975) Z. anorg. und allg. Chem., 414, 241—246.
7. Appel R., Knoll F., Michel W., Morbach W., Wihler H., Veltmann H. (1976) Chem. Ber., 109, 58—70.

8. Hashimoto M., Mukaiyama T. (1971) *Tetrahedron Lett.*, 2425—2428.
9. Jay E., Cashion P., Frikin M., Ramamoorthy S., Agrawal K., Caruthers M., Khorana H. G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 609—623.
10. Ohtsuka E., Murao K., Utsawa M., Ikehara M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 3441—3446.
11. Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Шубина Т. Н. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 1189—1195.
12. Zielinski W. S., Smrt J. (1974) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **39**, 2483—2490.
13. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 7332—7337.

Поступила в редакцию
26.VII.1977

После доработки
9.XII.1977

USE OF SOLVENT EXTRACTION FOR ISOLATION OF DEOXYDINUCLEOTIDES BEARING BIS-SUBSTITUTED 5'-PHOSPHATE

MISHENINA G. F., SAMUKOV V. V., SEMENOVA L. N.,
SHUBINA T. N.

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

Solvent extraction has been used for isolation of deoxydinucleotides bearing 5'-phosphodianilidate group from the reaction mixture. N-Protected deoxynucleoside 5'-phosphodianilidates were obtained by condensation of corresponding N-acyl deoxynucleotides and aniline with $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4$ mixture in pyridine and purified by column chromatography on silica gel in 55—70% yield. Mesitylenesulphonyl triazolidine and triisopropylbenzenesulphonyl chloride were used for internucleotide bond formation. Ten protected oligonucleotides were synthesized in 50—70% yield.