



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ЗАЩИЩЕННЫХ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ  
БЛОКОВ ФОСФОДИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
3'-О-МЕТОКСИАЦЕТИЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ  
НУКЛЕОТИДНОГО КОМПОНЕНТА

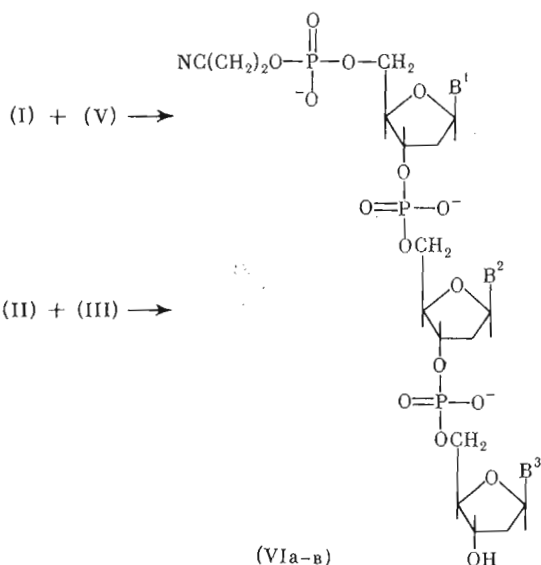
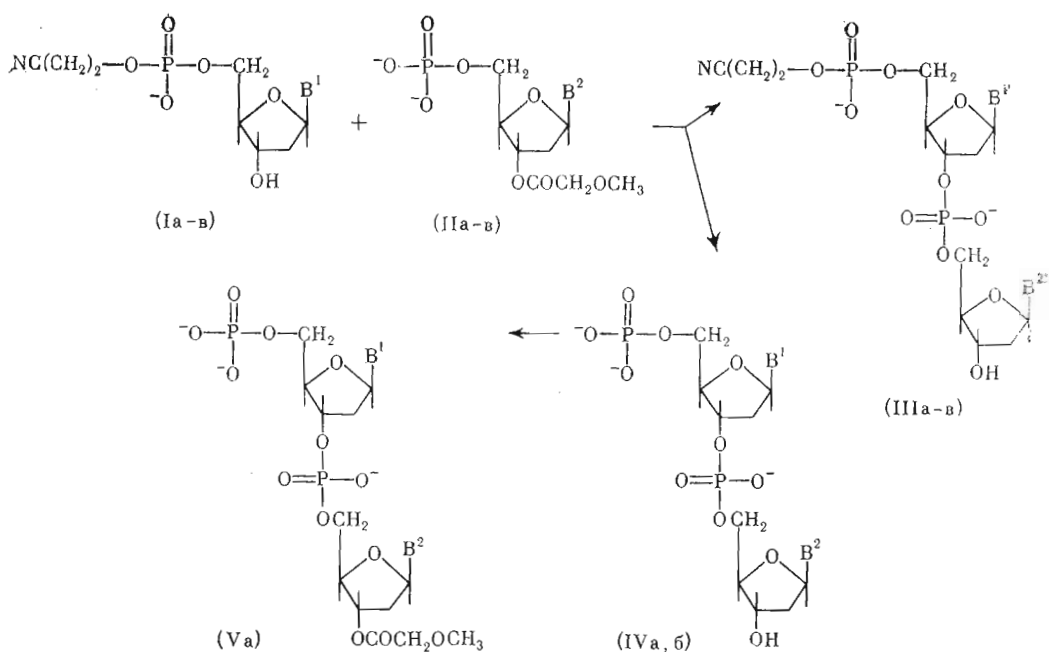
Константинов В. В., Мишарин А. Ю.

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Конденсация 5'-цианэтилового эфира N-защищенного моно- или олигонуклеотида с 3'-О-метоксиацетилированным N-защищенным моно- или олигонуклеотидом в присутствии арилсульфохлоридов, арилсульфотриазолидов или дициклогексилкарбодимидов с последующим избирательным удалением метоксиацетильной группы приводит к 5'-цианэтилированному N-защищенному олигонуклеотидному блоку.

Олигонуклеотиды и их аналоги находят широкое применение в биологических исследованиях. Это вызывает развитие новых методов синтетической химии олигонуклеотидов. Однако и в настоящее время классический фосфодиэфирный метод остается распространенным благодаря универсальности, надежности и использованию в качестве исходных соединений дезоксинуклеозид-5'-фосфатов — наиболее доступных коммерческих препаратов.

Ранее нами были получены 3'-О-метоксиацетильные производные N-защищенных природных дезоксинуклеозид-5'-фосфатов и показана возможность избирательного удаления метоксиацетильной группы в присутствии 5'-цианэтильной и N-защитных групп [1]. Цель настоящего сообщения — разработка метода получения 5'-цианэтилированных олигонуклеотидных блоков с использованием в качестве Р-компонента 3'-О-метоксиацетильного производного (II) (схема) с последующим удалением 3'-защитной группы. Такой путь вследствие сокращения числа стадий и количества реагента, очевидно, удобнее, чем 5'-цианэтилирование олигонуклеотида [2]. В качестве конденсирующих реагентов использованы 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид (TPS), мезитиленсульфохлорид (MS), N,N'-дициклогексилкарбодимид (DCC) и *n*-толуолсульфотриазолид (TST). Несмотря на меньшую скорость конденсации по сравнению с арилсульфохлоридами, применение TST [3] в фосфодиэфирном синтезе нам кажется перспективным из-за отсутствия апуринизации и легкости удаления избытка реагента после разложения реакционной смеси. Обработка реакционной смеси 8% раствором аммиака в абс. метаноле приводит к 5'-цианэтилированному нуклеотиду (III), а щелочной гидролиз — к динуклеотиду (IV). Все соединения легко разделяются при хроматографии на колонках с DEAE-целлюлозой. Использование линейного градиента концентрации бикарбоната аммония достаточно для отделения эфиров



- (I) а) B<sup>1</sup>=тимин; б) B<sup>1</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин; в) B<sup>1</sup>=N<sup>4</sup>-бензоилцитозин;  
 (II) а) B<sup>1</sup>=тимин; б) B<sup>1</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин; в) B<sup>1</sup>=N<sup>4</sup>-бензоилцитозин; г) B<sup>1</sup>=N<sup>2</sup>-ацетилгуанин;  
 (III) а) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=тимин; б) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин; в) B<sup>1</sup>=N<sup>4</sup>-бензоилцитозин, B<sup>2</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин;  
 (IV) а) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=тимин; б) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин;  
 (Va) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин;  
 (VI) а) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=тимин, B<sup>3</sup>=N<sup>6</sup>-бензоилцитозин; б) B<sup>1</sup>=B<sup>2</sup>=тимин, B<sup>3</sup>=N<sup>2</sup>-ацетилгуанин; в) B<sup>1</sup>=бензоилцитозин, B<sup>2</sup>=B<sup>3</sup>=N<sup>6</sup>-бензоиладенин.

(III) от непрореагировавшего мононуклеотида, элюируемого при более низких концентрациях соли.

Для получения 3'-O-метоксиацетилированного производного (V) пиридиниевую соль (IVa) обрабатывали избытком метоксиуксусного ангидрида в пиридине.

Синтез 5'-цианэтиловых эфиров тринуклеотидов (VI) показывает при-

менность данной комбинации защитных групп для ступенчатого (VI а, б) и блочного (VIв) наращивания олигонуклеотидной цепи.

Все соединения выделены в индивидуальном состоянии, их гомогенность показана данными тонкослойной хроматографии и хроматографии на ионообменной бумаге DE-81 в различных системах. Нуклеотидный состав доказывают данные спектров поглощения (табл. 1) и спектров ПМР (табл. 2). Наличие 5'-цианэтильной и 3'-О-метоксиацетильной групп определяли из спектров ПМР. После полного удаления защитных групп получаемые соединения полностью гидролизуются фосфодиэстеразой змеиного яда, нуклеотидный состав гетерогенных блоков совпадает с рассчитанным.

Следует отметить, что предлагаемая модификация фосфодиэфирного метода позволяет:

1) использовать дезоксинуклеозид-5'-фосфаты для получения обоих компонентов конденсации;

2) получать в одну стадию 5'-защищенный олигонуклеотидный блок, который можно использовать в качестве ОН-компонента в следующей конденсации;

3) избежать трудностей, обычно встречающихся при хроматографическом выделении олигонуклеотидных блоков, несущих 5'-липофильные защитные группы;

4) проводить синтез олигомера присоединением блока как с 3', так и с 5'-конца.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на приборе «Specord UV-Vis» (ГДР) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) в кювете с длиной оптического пути 1 см, спектры ПМР — на приборах BS-487C (ЧССР) и «Varian XL-100» (США) в  $^2\text{H}_2\text{O}$  с *трет*-бутанолом в качестве внутреннего стандарта. ТСХ проводили на пластинках «Silufol UV-254» (ЧССР) в системах: изопропанол —  $\text{NH}_4\text{OH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 7 : 1 : 2;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — бутанол —  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 : 5 : 3; изопропанол — 1 М ТЕАВ (рН 7,5) 7 : 3. Хроматографию на бумаге DE-81 «Whatman» (Великобритания) проводили в 0,25 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , в качестве стандарта используя рdT.

Пиридин очищали по методике [4] и хранили над  $\text{CaH}_2$ , TPS (Merck, ФРГ) и MS, полученный по методике работы [5], кристаллизовали из пентана перед конденсацией. По описанным методикам получали TST [3] и метоксиуксусный ангидрид [6]. Дезоксинуклеозид-5'-фосфаты (СКТБ БАВ) использовали без дальнейшей очистки. N-Ацетилирование рdG проводили по методике [7], N-бензоиллирование рdA и рdC [8] — по модифицированной методике (см. ниже), производные (I) и (II) получали как описано ранее [1].

*pdbzA* и *pdbzC*. Пиридиновую соль нуклеотида (30 ммоль) высушивали упариванием с абс. пиридином, затем добавляли 90 мл абс. пиридина, охлаждали до  $-20^\circ\text{C}$ , при охлаждении и интенсивном перемешивании добавляли 30 мл бензоилхлорида. Температуру реакционной смеси за 1 ч повышали до  $20^\circ\text{C}$ , перемешивали 1 ч при  $20^\circ\text{C}$ , охлаждали до  $-20^\circ\text{C}$ , добавляли 70 мл абс. этанола, перемешивали 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ , концентрировали до  $1/4$  объема, растирали с 500 мл смеси эфир — гексан (1 : 1), декантируя растворитель. Остаток растворяли в 300 мл хлороформа, раствор промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  до прекращения выделения газа, водный слой экстрагировали равным объемом хлороформа, хлороформный экстракт сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали, многократно упаривали с добавлением абс. этанола. Остаток растворяли в смеси 100 мл этанола и 150 мл 2 н.  $\text{LiOH}$ , выдерживали 20 мин, нейтрализовали 2 н.  $\text{HCl}$ , упаривали досуха, повторно упаривали с абс. этанолом, добавляли 300 мл абс. этанола и фильтровали. Осадок многократно промывали на фильтре абс. этанолом, затем абс. эфиром и сушили в вакууме.

Синтез 5'-цианэтилованных ди- и трипуклеотидных блоков

ОН-компонент	Р-Компонент		Конденсирующий реагент, ммоль	Время, ч	Продукт реакции		Выход, %	УФ-спектр			
	номер соединения	количество, ммоль			номер соединения	количество, ммоль		$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{\min}$ , нм	$\epsilon_{290} / \epsilon_{260}$	
(Ia)	1,00	(IIa)	1,5	MS (5,0)	4,5	(IIIa)	0,52	52	267	235	0,70
(Ia)	1,00	(IIa)	1,5	TST (6,0)	24	(IIIa)	0,60	60			
(Iб)	0,60	(IIб)	1,2	TPS (4,0)	5,5	(IIIб)	0,30	50	280	244	1,76
(Iб)	0,50	(IIб)	0,75	TST (3,0)	20	(IIIб)	0,23	46			
(Iв)	0,40	(IIб)	0,80	TST (2,5)	36	(IIIв)	0,14	36	260пл, 278	233	0,90
(Iв)	0,60	(IIб)	0,40	DCC (2,0)	96	(IIIв)	0,12	30	302пл		
(IIIa)	0,20	(IVa)	0,60	MS (1,9)	5,0	(VIa)	0,08	40	260, 302	234	0,54
(IIIa)	0,20	(IVa)	0,5	TST (2,5)	28	(VIa)	0,08	40			
(IIIa)	0,15	(IVг)	0,45	DCC (4,5)	144	(VIб)	0,04	28	262	232	0,66
(IIIa)	0,10	(IVг)	0,50	TST (2,5)	40	(VIб)	0,04	40			
(Iв)	0,50	(Va)	0,13	TST (1,5)	36	(VIв)	0,04	31	261, 280, 302пл	232	1,09

Для *pdbzA* УФ-спектр:  $\lambda_{\max}$  280,  $\lambda_{\min}$  244 нм. Спектр ПМР,  $\delta$ : 8,79с, 8-Н; 8,64с, 2-Н; 7,30–7,96м, Вз; 6,61 псевдотриплет, 1'-Н; ( $J_{1', 2'} - J_{1', 2''}$  7,0); 3,95м, 5'-Н; 2,40–2,95м, 2'-Н. Выход 27,0 ммоль (90%).

Для *pdbzC* УФ-спектр:  $\lambda_{\max}$  260, 302 нм,  $\lambda_{\min}$  230, 286 нм. Спектр ПМР,  $\delta$  ( $J$ , Гц): 8,42д (7,8), 6-Н; 7,45–7,95м, Вз; 7,42д (7,8), 5-Н; 6,21 псевдотриплет, 1'-Н ( $J_{1', 2'} - J_{1', 2''}$  6,9); 4,07м, 5'-Н; 2,10–2,60м, 2'-Н. Выход 27,9 ммоль (93%).

5'-Цианэтиловые эфиры *N*-защищенных динуклеотидов (III). а. Компоненты конденсации (пиридинные соли) высушивали упариванием с абс. пиридином, добавляли TST (количества реагентов и время реакции см. в табл. 1), упаривали до начала кристаллизации и перемешивали в вакууме при 20°С, затем охлаждали до 0°С, добавляли 15 мл воды, перемешивали 5 ч и фильтровали от кристаллического осадка, осадок промывали 10% водным пиридином. Фильтрат упаривали досуха, затем упаривали несколько раз с добавлением абс. этанола, остаток растворяли в 8% растворе  $\text{NH}_3$  в абс. метаноле (5 мл на 1 ммоль Р-компонента), выдерживали 12 мин в плотно закрытом сосуде, упаривали досуха, повторно упаривали с абс. этанолом, растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку (6×40 см) с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ). Колонку промывали водой, хроматографию проводили с использованием линейного градиента концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (от 0 до 0,25 М, объем 9 л). Фракции, содержащие 5'-цианэтиловый эфир динуклеотида (III), упаривали с добавлением воды и лиофилизировали. Константы полученных соединений приведены в табл. 1 и 2.

б. Компоненты конденсации (I) и (II) (пиридинные соли) высушивали упариванием с абс. пиридином, добавляли свежекристаллизованный сульфохлорид (MS или TPS) (количества реагентов и время реакции в табл. 1), упаривали до начала кристаллизации и перемешивали в эвакуированной колбе при 20°С, затем охлаждали до -20°С, добавляли 2-кратный избыток триэтиламина в абс. пиридине, выдерживали 4 ч при 0°С, добавляли равный объем 0,2 М TEAB, выдерживали 14 ч при 4°С, разбавляли 20 мл воды, экстрагировали эфиром (3×40 мл), эфирный слой промывали 0,2 М TEAB, водные фазы объединяли, упаривали, затем удаляли метоксиацетильные группы и выделяли продукты, как в пункте а.

в. Компоненты конденсации (I) и (II) (пиридинные соли) высуши-

Химические сдвиги протонов,  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц), аммониевых солей соединений (III)–(VI)

Номер соединения	$5\text{-H}$ (2-H, 3-CH <sub>3</sub> )	6-H (8-H)	1'-H	2'-CH <sub>2</sub>	5'-CH <sub>2</sub>	Другие сигналы
(IIIa)	1,89 уш. с	7,68 уш. с	6,27г	2,44–2,57м	4,10м	4,05к* (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,80г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ (CNEt)
(IIIб)	8,30с; 8,32с; 8,38с; 8,46с	8,38с; 8,46с	6,08г; 6,36г	2,35–3,00м	4,15м	3,99к (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,74г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ (CNEt); 7,00–7,85м, Bz
(IIIв)	7,27д (7,9) 8,46с, 8,34с	7,97д (7,9) 8,46с, 8,34с	6,20–6,56м	2,30–2,70м	3,80–4,30м	3,99к (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,74г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ (CNEt); 7,15–7,90м, Bz
(IVa)	1,92 уш. с	7,72с; 7,74с	6,30г	2,44–2,70м	4,14м	
(IVб)	8,20с; 8,30с; 8,33с; 8,41с	8,33с; 8,41с	6,10г 6,30г	2,15–2,80м	3,90–4,30м	7,00–7,85м, Bz
(Vв)**	8,28с; 8,38с; 8,47с; 8,54с	8,47с; 8,54с	6,15г 6,35г	2,33–2,90м	3,95–4,32м	5,66м, 3'-H; 3,47с, OCH <sub>3</sub> (MeAc); 4,26с, CH <sub>2</sub> (MeAc); 7,00–7,75м, Bz
(VIa)	1,82 уш. с H5 скрыт Bz	7,66 уш. с 8,40д (7,9)	6,20–6,50м	2,12–2,70м	4,00–4,30м	4,08к (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,90г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ , 7,20–7,90м, Bz и 5-II
(VIб)	1,87 уш. с	7,36 уш. с; 7,66 уш. с; 8,20с	6,11–6,33м	2,12–2,80м	4,00–4,30м	4,08к (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,81г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,21с, Ac
(VIв)	7,15д (7,9) 8,38с; 8,28с; 8,46с; 8,54с	7,90д (7,9) 8,46с; 8,54с	6,00–6,57м	2,20–2,95м	3,80–4,20м	3,90к (6,0), $\alpha\text{-CH}_2$ (CNEt); 2,74г (6,0), $\beta\text{-CH}_2$ (CNEt); 7,00–7,85м, Bz

\* Вследствие взаимодействия  $\alpha\text{-CH}_2$ -протона с ядром фосфора ( $J_{PH}$ , 6Гц).

\*\* Лигандная соль.

вали упариванием с абс. пиридином, растворяли в абс. пиридине, добавляли DCC (количества реагентов и время реакции в табл. 1), добавляли равный объем воды, перемешивали 14 ч, фильтровали, промывали осадок 10% водным пиридином, водный раствор промывали 3 раза равным объемом смеси эфир — гексан (1:1), упаривали, затем удаляли метоксиацетильные группы и выделяли продукты, как в примере а.

*Динуклеотиды (IVa) и (IVб).* Конденсацию проводили в присутствии TST, как описано выше. После разложения реакционной смеси продукты реакции обрабатывали 1 н. NaOH (5 мл на 1 ммоль нуклеотида) в течение 7 мин, нейтрализовали добавлением избытка дауэкса-50 (пиридиновая форма). Смола промывали 5% водным пиридином, водный раствор упаривали и динуклеотиды (V) выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе (колонка 6×40 см, линейный градиент от 0 до 0,30 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , объем 9 л). Выход и константы — в табл. 1 и 2.

*3'-О-Метоксиацетилование динуклеотида. (Va).* Высушивали упариванием с абс. пиридином 0,20 ммольа d(pbzApbzA) (IVб, пиридиновая соль), растворяли в 3 мл абс. пиридина, добавляли 0,5 мл метоксиуксусного ангидрида, смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, затем охлаждали до 0°С, добавляли 1,5 мл абс. метанола, выдерживали 1 ч при 4°С, раствор упаривали до объема 1,5 мл и по каплям при перемешивании выливали в 100 мл смеси эфир — гексан (1:1), растворитель декаантировали, осадок растворяли в 3 мл пиридина, к раствору добавляли 3 мл воды, оставляли на 2 ч при 20°С, затем упаривали, растворяли в воде и пропускали через колонку с 5 мл смолы дауэкс-50 (литиевая форма), элюируя водой. Раствор упаривали, сушили упариванием с абс. этанолом, осадок размешивали с 20 мл абс. этанола и центрифугировали. Промывали 20 мл абс. этанола, снова центрифугировали. Полученную литиевую соль промывали эфиром и сушили в вакууме. УФ-спектр идентичен спектру (IVб), спектр ПМР — в табл. 2. Выход 0,184 ммоль (92%).

*5'-Цианэтиловые эфиры N-защищенных тринуклеотидов (VI).* Синтез проводили аналогично получению 5'-цианэтиловых эфиров динуклеотидов (см. выше). Количества реагентов, время реакций приведены в табл. 1. Хроматографическое разделение реакционных смесей проводили на DEAE-целлюлозе (колонка 6×40 см и 4,5×30 см, линейный градиент от 0 до 35 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , объем 9 л). Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 1 и 2.

*Удаление защитных групп.* Раствор 20 ОЕ<sub>260</sub> N-защищенного олигонуклеотида в 2 мл конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$  выдерживали 48 ч при 20°С, упаривали и пропускали через колонку с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ , 1×12 см), элюируя нуклеотид с использованием линейного градиента  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 → 0,35 М, объем 0,4 л). Фракцию, содержащую олигонуклеотид, подвергали ферментативному расщеплению по описанной методике [9].

Авторы благодарны О. Л. Поляновскому за постоянное внимание к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Константинов В. В., Мишарин А. Ю. (1980) Биоорган. химия, 6, 62—66.
2. Weber H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 219—249.
3. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332—7336.
4. Riddick J. A., Bunger W. B. (1971) in: Organic Solvents, vol. 2, «Techniques of Chemistry», Wiley, N. Y.
5. Jacob T. M., Khorana H. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1630.
6. US Patent № 2017187 (1932); C. A. (1935) 29, 8007.
7. Lohrman R., Soli D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 819—829.
8. Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 1467—1470.
9. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.

Поступила в редакцию  
12.VI.1980

**SYNTHESIS OF PROTECTED DEOXYRIBOOLIGONUCLEOTIDE BLOCKS  
BY PHOSPHODIESTER APPROACH USING 3'-O-METHOXYACETYL  
PROTECTION FOR A NUCLEOTIDE COMPONENT**

KONSTANTINOV V. V., MISHARIN A. Yu.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Condensation of 5'-cyanoethylated N-protected mono- or oligonucleotide with 3'-O-methoxyacetylated N-protected mono- or oligonucleotide in the presence of arylsulphonylchlorides, arylsulphonyltriazolides or dicyclohexylcarbodiimide followed by selective removal of methoxyacetyl group gave a 5'-cyanoethylated N-protected oligonucleotide block.

---