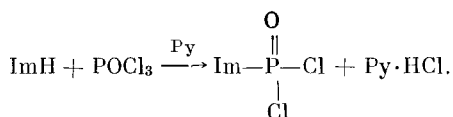


М. В. БУДАНОВ, В. К. ПОТАПОВ, З. А. ШАБАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

## СИНТЕЗ 3'-ФОСФАТОВ НУКЛЕОЗИДОВ И ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

Твердофазный метод синтеза олигонуклеотидов позволяет более широко использовать при образовании межнуклеотидной связи высокоактивные фосфорилирующие агенты. Ранее было показано, что эффективное фосфорилирование нуклеозида, закрепленного на носителе, может быть проведено обработкой его хлорокисью фосфора в абсолютном пиридине <sup>(1)</sup>, а образовавшийся при этом полимер — нуклеозиддихлорфосфат эффективно взаимодействует с 5'-гидроксильной группой нуклеозида или динуклеозидфосфата <sup>(2)</sup>. Однако подобный метод оказался малопригодным при синтезе более длинных олигонуклеотидов, поскольку обработка хлорокисью фосфора даже полимер-динуклеозидфосфата в пиридине приводит к значительной деградации межнуклеотидной связи за счет атаки хлорокиси фосфора по гидроксильной группе межнуклеотидного атома фосфора с последующим распадом образовавшегося несимметричного пирофосфата при обработке его водой. И хотя собственно реакция фосфорилирования 3'-гидроксильной группы динуклеозидфосфата протекает при этом практически количественно, конечный выход динуклеотида составляет всего 15—20%. Проведенное нами исследование ряда активных фосфорилирующих агентов показало, что перспективными соединениями, лишенными перечисленных выше недостатков, являются имидазол и аниlid дихлорфосфорной кислоты. Первый — благодаря высокой активности при фосфорилировании, второй — за счет большей устойчивости и мягкости удаления анилидной группировки <sup>(3)</sup>. Настоящая работа посвящена изучению первого из них.

Имидазол дихлорфосфорной кислоты может быть получен непосредственным смешением эквимольных количеств имидазола и хлорокиси фосфора в абсолютном пиридине и использован без выделения:



Фосфорилирование полимер-нуклеозида и полимер-динуклеозидфосфата проводится в условиях, разработанных для хлорокиси фосфора (5—10 мин. при 5° С). Избыток фосфорилирующего агента может изменяться от 100 до 1000-кратного, поскольку удаление его в твердофазном методе синтеза легко осуществляется простой промывкой носителя абсолютным пиридином.

Полученный на этой стадии нуклеозид-3'-фосфат отщепляют от носителя по стандартной методике <sup>(4)</sup> обработкой 2% трифторуксусной кислотой в абсолютном бензоле, причем фосфоамидная связь также количественно гидролизуеться в этих условиях, что следует отнести к преимуществам применения данного реагента.

Результаты опытов по фосфорилированию полимер-нуклеозидов и полимер-динуклеозидфосфатов представлены в табл. 1. Как видно из данных

таблицы, моноимидазолиддихлорфосфат является не менее активным фосфорилирующим агентом, чем хлорокись фосфора, и выгодно отличается от нее универсальностью действия — с одинаково высоким выходом (до 100%) фосфорилирует нуклеозиды и олигонуклеотидные блоки без побочных реакций.

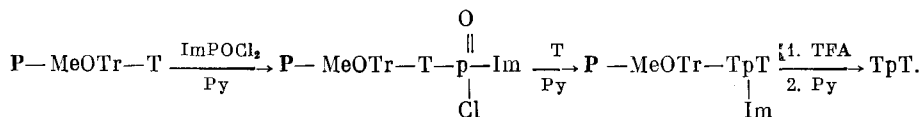
Естественным продолжением этой части работы было изучение реакции конденсации полученного на первой стадии полимер-нуклеозидфос-

Таблица 1

Выход синтезированных моно- и динуклеотидов

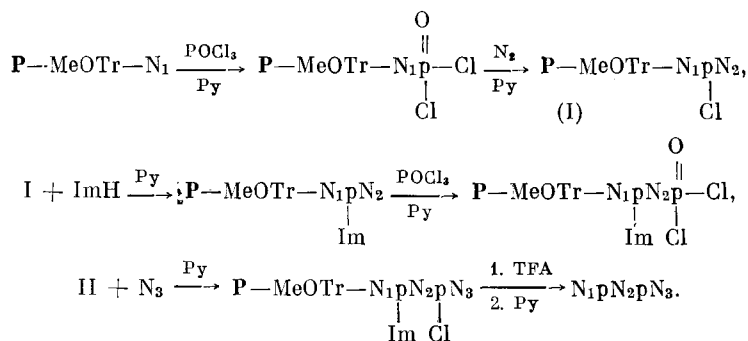
Исходное соединение	Фосфорилирующий агент	Продукт реакции	Выход, %
P — dT	ImPOCl <sub>2</sub>	dTp	90
P — dC <sup>an</sup>	ImPOCl <sub>2</sub>	dCp <sup>an</sup>	87
P — d(TpT)	ImPOCl <sub>2</sub>	d(TpTp)	100
P — d(TpT)	POCl <sub>3</sub>	d(TpTp)	86
Im	ImPOCl <sub>2</sub>	d(TpTp)	84
P — d(TpA <sup>bz</sup> )	ImPOCl <sub>2</sub>	d(TpAp <sup>bz</sup> )	80
P — d(TpC <sup>an</sup> )	ImPOCl <sub>2</sub>	d(TpCp <sup>an</sup> )	82
P — d(C <sup>an</sup> pA <sup>bz</sup> )	ImPOCl <sub>2</sub>	d(Cp <sup>an</sup> Ap <sup>bz</sup> )	93

фоимидазолидхлорида с нуклеозидом без дополнительной активации. Реакция была проведена на примере синтеза тимидил- (3'→5')-тимидина:



Однако выход динуклеозидфосфата в этом случае не превышал 30—40%, что свидетельствует о меньшей активности атома фосфора в этой группировке по сравнению с дихлорфосфатами. Фосфорилирование проводилось описанным выше способом, избыток фосфорилирующего агента отмывался абсолютным пиридином, и носитель обрабатывали 10—20-кратным избытком тимидина в абсолютном пиридине в течение 16—24 час. при комнатной температуре.

Таким образом, по-видимому, более перспективной является следующая схема синтеза:



Присоединение имидазола по межнуклеотидной хлорфосфатной группе осуществляется обработкой полимера I 50—500-кратными избытками имидазола в абсолютном пиридине при комнатной температуре в течение 40—60 мин. с последующей отмывкой носителя от избытка имидазола пи-

ридином. Как было показано, фосфорилирование полимер-динуклеозид-фосфата, защищенного по межнуклеотидному фосфору импидазолом, может быть осуществлено как чистой хлорокисью фосфора, так и моноимпидазолиддихлорфосфатом практически с одинаковыми выходами 80—90%. При этом важнейшим обстоятельством является то, что ни в том, ни в другом случае не происходит распада межнуклеотидной связи как на стадии фосфорилирования, так и во время кислотной обработки носителя при удалении с него продуктов синтеза. Практически количественное образование при этом способе синтеза олигонуклеотидов природной 3'→5'-межнуклеотидной связи доказано ферментативным гидролизом динуклеотида d(CpAp) неочищенным змеиным ядом.

Таким образом, метод достаточно перспективен для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и их 3'-фосфатов, которые далее могут быть использованы в олигонуклеотидном синтезе в качестве нуклеотидной компоненты.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
28 X 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> М. М. Кабачник, В. К. Поганов и др., ДАН, т. 195, 1344 (1970). <sup>2</sup> М. М. Кабачник, Н. Г. Тимофеева и др., ЖОХ, т. 43, 379 (1973). <sup>3</sup> E. Ohtsuka, K. Murao et al., J. Am. Chem. Soc., v. 93, 3441 (1970).