



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.962.32

## ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Обзор посвящен вопросам химического синтеза олигорибонуклеотидов. Рассмотрены различные конденсирующие агенты и защитные группы, применяемые в олигонуклеотидном синтезе. Приведена сравнительная характеристика диафирного и триэфирного методов создания межнуклеотидной связи, различных вариантов получения защищенных производных нуклеозидов и нуклеотидов. Заключительная часть обзора посвящена перспективам развития олигорибонуклеотидного синтеза.

Химический синтез олигонуклеотидов представляет собой одну из наиболее интересных и сложных проблем синтетической органической химии. В синтезе дезоксиолигонуклеотидов в последнее десятилетие достигнуты значительные успехи. Так, в лаборатории Кораны был синтезирован ген аланиновой тРНК, состоящий из 77 нуклеотидных остатков [1]. Успехи в области химического синтеза олигорибонуклеотидов значительно скромнее. Наличие *цис*-гликольной группировки осложняет получение соответствующих защищенных нуклеозидов и нуклеотидов и является причиной изомеризации и более легкого расщепления межнуклеотидной связи в олигорибонуклеотидах.

При разработке методов синтеза 3'—5'-межнуклеотидной связи необходимо решить две основные задачи:

- 1) получения защищенных мономерных единиц (нуклеозидов и нуклеотидов), имеющих только одну реакционноспособную группу;
- 2) конденсации мономеров с образованием 3'—5'-фосфодиэфирной связи.

Получение достаточно длинных олигонуклеотидов с разумными выходами возможно лишь при выходах, близких к количественным на каждой стадии образования межнуклеотидной связи. Кроме того, неполное протекание реакции затрудняет разделение реакционной смеси и получение индивидуальных соединений.

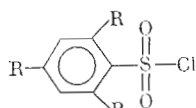
### 1. Конденсирующие реагенты и защитные группы в олигонуклеотидном синтезе

В то время как методы синтеза защищенных нуклеозидов и нуклеотидов в настоящее время достаточно хорошо разработаны, методы образования межнуклеотидной связи, несмотря на значительное число предложенных конденсирующих агентов, не позволяют получать олигонуклеотиды с хорошими выходами. Особые требования к выходам на стадии конденсации определяются многостадийностью олигонуклеотидного синтеза.

Практически для создания межнуклеотидной связи применяются два основных метода. В первом из них, «фосфодиэфирном», межнуклеотидная связь возникает при взаимодействии активированного моноэфира фосфорной кислоты (нуклеотидной компоненты) и гидроксильной группы нуклеозидной компоненты. Наиболее широко применяются для этой цели  $N,N'$ -дициклогексилкарбодимид (DCC) (I) [2—4]



и хлорагидриды ароматических сульфокислот, прежде всего мезитиленсульfoxлорид (MS) (II) [3, 4] и 2,4,6-триизопропилбензолсульfoxлорид (TPS) (III) [5].

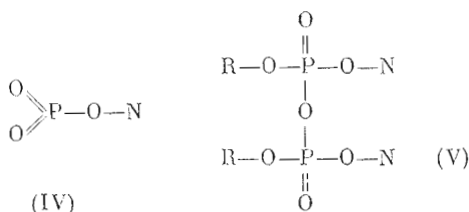


R = метил (II), изопропил (III)

Главная особенность этих конденсирующих реагентов состоит в том, что они могут активировать как моно-, так и диэфиры фосфорной кислоты, в то время как в присутствии  $N,N'$ -дициклогексилкарбодимида в стандартных условиях, применяемых в олигонуклеотидном синтезе, реагируют преимущественно моноэфиры фосфорной кислоты. Высокая активность арилсульfoxлоридов лежит в основе так называемого триэфирного метода синтеза олигонуклеотидов, которому в настоящее время отдается предпочтение по сравнению с классическим «диэфирным» методом (о преимуществах и недостатках «триэфирного» метода см. раздел 4).

В отдельных случаях используется также  $N,N'$ -диизопропилкарбодимид [4], соли  $N$ -этил-5-фенилизоксазолия [4], трихлорацетонитрил [6—8], пикрилхлорид [8—10], ди( $\alpha$ -пиридил)карбонат [11, 12], циклогексидизоцианид [13], моноэфиры дихлорфосфорной кислоты [14], в частности  $\beta,\beta,\beta$ -трихлорэтиловый [15] и фениловые [16—18] эфиры. Недавно в качестве конденсирующих агентов были предложены амиды ароматических сульфокислот: мезитиленсульфонилимидазолид [19, 20] и мезитиленсульфонил-1,2,4-триазолид [21, 22], применение которых позволяет увеличить выходы на стадии конденсации, особенно в случае производных гуанозина. При этом реакция не сопровождается сульфированием, как в случае самих арилсульfoxлоридов [5].

Механизм образования межнуклеотидной связи в присутствии конденсирующих реагентов довольно сложен [23—32]. Активация моноэфира фосфорной кислоты арилсульfoxлоридами происходит через образование пиро-, три- и тетрафосфатов нуклеозидов и заканчивается образованием метафосфата нуклеозида (IV) [27, 30]. В случае активации диэфира фосфорной кислоты образуются тетразамещенные пирофосфаты (V) [29, 30].



N — нуклеозид,

R — защитная группа.

Опасность взаимодействия активированного производного нуклеотида с водой заставляет проводить синтез олигонуклеотидов в строго безводных условиях. В качестве растворителя обычно применяют пиридин, который абсолютируют с использованием *n*-толуолсульfoxлорида или гидрида

кальция. Необходимость применения пиридина часто вызывает трудности, связанные с плохой растворимостью в нем производных нуклеозидов и особенно нуклеотидов.

Активированное производное нуклеотидной компоненты может вступать в реакцию не только с гидроксильной группой нуклеозидной компоненты, но и с другими нуклеофильными функциональными группами (аминогруппы гетероциклических оснований, фосфатные группы, гидроксильные группы углеводного остатка). Для устранения этих побочных реакций функциональные группы приходится блокировать. Поэтому проблема защитных групп является одной из ключевых в олигонуклеотидном синтезе.

К защитным группам, применяемым в олигонуклеотидном синтезе, предъявляются жесткие и порой противоречивые требования:

- 1) мягкие условия и селективность введения;
- 2) устойчивость в процессе синтеза межнуклеотидной связи и выделения продуктов реакций;
- 3) возможность селективного удаления одних защитных групп без затрагивания других;
- 4) отсутствие побочных реакций (расщепление и изомеризация фосфодиэфирной межнуклеотидной связи, расщепление гликозидной связи, дезаминирование и т. д.) при окончательном полном деблокировании на последней стадии.

По условиям удаления защитные группы обычно разделяют на кислотолабильные, щелочолабильные и группы, снимающиеся в особых условиях (например,  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтильная, фениламидная и др., см. таблицу). Для защиты гидроксильных групп широко применяются такие кислотолабильные группы, как тритильные, которые могут быть селективно введены по первичной 5'-гидроксильной группе, и тетрагидропиранильные. Учитывая, что легкость изомеризации трифенилкарбинолов повышается с введением каждой *n*-метоксигруппы в ароматическое ядро, Корана и сотр. [34] предложили использовать для защиты 5'-гидроксильных *n*-метокситритильную и ди-*n*-метокситритильную защитные группы, которые удаляются в более мягких условиях по сравнению с тритильной группой, но в то же время заметно устойчивее по сравнению с три-*n*-метокситритильной группой.

Тetraгидропиранильная защитная группа имеет существенный недостаток: введение ее посредством реакции с дигидропираном, катализируемой кислотами, приводит к возникновению нового асимметрического атома углерода и, следовательно, к смеси диастереоизомеров. Чтобы избежать этого, была предложена симметричная 4-метокситетрагидропиранильная защитная группа [36].

Для защиты гидроксильных групп и аминокрупп гетероциклических оснований используют также щелочолабильные ацильные группы (ацетильная, бензоильная, анизоильная и др.). Аминогруппы цитидина и аденозина защищают с помощью арильных групп, а гуаниновое гетероциклическое основание — с помощью алканоильных, так как N<sup>2</sup>-бензоилгуанозин очень устойчив к щелочному гидролизу [47] (см. таблицу).

Для защиты остатков фосфорной кислоты используют главным образом щелочолабильную  $\beta$ -цианэтильную либо  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтильную группу, которая удаляется обработкой цинк-медной парой в диметилформамиде [53, 54] (см. таблицу).

Несмотря на применение защищенных производных нуклеозидов и нуклеотидов, образование межнуклеотидной связи все же сопровождается побочными реакциями (например, образованием пирофосфатов), в результате чего требуется тщательная хроматографическая очистка продуктов реакции.

Схема синтеза 3'—5'-межнуклеотидной связи может быть представлена двумя вариантами: 1) нуклеозид-3'-фосфат конденсируют с нуклео-




Основные защитные группы в олигонуклеотидном синтезе

Название защитной группы	Формула	Субстрат	Условия удаления защитной группы	Время полугидролиза*, мин	Литература
<i>A. Гидроксильные группы</i>					
1. Тритильная	$\text{—C—PhMe}_3$	TrU*** MeOTrU	80% AcOH, 20° »	2880** 120**	34 34
2. Метоксикентрильная	$\text{—C—(PhOMe)}_2$	(MeO) <sub>2</sub> TrU	»	15**	34
3. Диметокситрильная	$\text{—C—(PhOMe)}_2$	(MeO) <sub>2</sub> TrU	»	1**	34
4. Триметокситрильная	$\text{—C—(PhOMe)}_3$	(MeO) <sub>3</sub> TrU	»	67	16.35
5. Тетрагидропирильная		U(Thp)	pH 2; 22°		
6. Метоксициклогексильная		U(MeOCHx)	pH 4; 20°	10	36
7. 4-Метоксиэтетрагидропирильная		U(ThpOMe) MeOThpU	pH 2; 20° »	24 10,5	36 36
8. 4-Метоксиэтетрагидропирильная		MeOThsT <sub>d</sub>	»	2	37
9. Этоксипирильная	$\text{—CH—CH}_3$ $\text{—OEt}$	AcU(EtOEt)p	5% AcOH, 20°	120**	38
10. Изопропилиденная	$\text{>CMe}_2$	U(>CMe <sub>2</sub> )	pH 2; 26°	1200	39
11. 4-Метоксибензиллиденная		U(>CHPhOMe)	80% AcOH, 25°	600**	34
12. 2,4-Диметоксибензиллиденная		U[>CHPh(OMe) <sub>2</sub> ]	»	60	40,41

(продолжение)

Название защитной группы	Формула	Субстрат	Условия удаления защитной группы	Время полугидролиза *, мин	Литература
13. Диметиламинобензальдегидовая		U(>CHPhNMe2)	80% AcOH, 25°	60	40, 41
14. Метоксиэтилбензальдегидовая		U(>CHOMe) A(>CHOMe) U(>CHOMe)	pH 2; 20° » 98% HCOOH, 20°	10,5 36 1**	42 42 42
15. Этоксиметилбензальдегидовая		A(>CHOEt)	80% AcOH, 20°	45	43
16. Метоксиметилбензальдегидовая		U(>C.MeOMe)	pH 5,6; 20°	39	44
17. Бензольная		BzU(CMe2)	pH 11; 20°	680	40
18. Ацетильная		AcU(>C.Me2) AcU	pH 11,6; 20° NH3 в MeOH ****, 22°	100 59	40 45
19. Формильная		HCOU(>CMe2)	pH 10; 20°	22	40
20. Метоксацетильная		MeOAcU	NH3 в MeOH ****, 22°	2,5	45
21. Феноксацетильная		PhOAcU	»	<1	45
Б. Алилозгруппы гетероциклических осцивалей					
4. Ацетильная		ac pC <sub>d</sub> Ac ac G	9 M NH <sub>4</sub> OH, 20° pH 13; 20° NH <sub>3</sub> в MeOH ****, 20° MeNH <sub>2</sub> -- EtOH (1:2), 20°	1,5 3,5 42 5	46 46 47 47

Название защитной группы	Формула	Субстрат	Условия удаления защитной группы	Время полугидролиза*, мин	Литература
2. Бензильная		bz pC <sub>d</sub> bz pA <sub>d</sub> bz G	9 M NH <sub>4</sub> OH, 20° pH 13; 20° 9 M NH <sub>4</sub> OH, 20° NH <sub>3</sub> в MeOH ****, 20° MeNH <sub>2</sub> — EtOH (1:2), 20° 9 M NH <sub>4</sub> OH, 20° pH 14; 20°	16 150 228 1550 200 64 300	46 46 48 47 47 46 46
3. Анисильная		an pC <sub>d</sub>	9 M NH <sub>4</sub> OH, 20° pH 14; 20°	64 300	46 46
4. Диметиламинометиленовая	$=\text{CHNMe}_2$	dim C	pH 2; 20° pH 12; 20°	250 68	49 49
<i>В. Фосфатные группы</i>					
1. β-Ципанэтильная	$-\text{CH}_2\text{C}(\text{CN})_2$	(CNEt)pT <sub>d</sub> bz BzA(Bz)p(CNEt)	0,1 M NaOH, 50° 7 M NH <sub>4</sub> OH, 20° »	4** 600** 30**	50 51 51
2. 2-Ацетил-2-метилэтильная		bz BzA(Bz)p(iPrAc)	»	30**	51
3. Фенильная		T <sub>d</sub> p(Ph)T <sub>d</sub>	0,1 M NaOH, 20° Диоксан — вода, 4:1 »	3,4 2,4 1,3	16 16 16
4. n-Хлорфенильная		T <sub>d</sub> p(n-ClPh)T <sub>d</sub>	»	2,4	16
5. o-Хлорфенильная		T <sub>d</sub> p(o-ClPh)T <sub>d</sub>	»	1,3	16

Название защитной группы	Формула	Субстрат	Условия удаления защитной группы	Время полугидролиза *, мин	Литература
6. <i>α</i> -Пирролидиновая		(R <sub>1</sub> Et) <sub>2</sub> pT <sub>d</sub>	MeONa в пиридине, 0°	2880 **	52
7. Трихлорэтильная	-CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	(Cl <sub>3</sub> Et) <sub>2</sub> pT <sub>d</sub>	Zn/Cu, DMF, 50° Zn/Cu, 80% AcOH, 20°	60 ** 300 **	53, 54 53, 54
8. Бензидрильная	-CHPh <sub>2</sub>	Up(CHPh <sub>2</sub> )	80% AcOH, 25°	15	40
9. Трет-бутильная	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	T <sub>d</sub> p( <i>t</i> Bu)	»	45	40
10. Фениламидная		<sup>bz</sup> C(Bz) <sub>2</sub> p(NHPh)	Изоамилнитрит Ru — AcOH (1:1), 20°	240 **	55
11. Тиозильная	-S-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(EtS) <sub>2</sub> pT <sub>d</sub> Ac	Иод, ацетон — вода (1:1), 20°	240 **	56
12. Фенилтоэтильная	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> S- 	(PhSEt) <sub>2</sub> pT <sub>d</sub>	1) NaIO <sub>4</sub> , 2) 2 M NaOH, 20° 1) Хлорсукцинимид, 2) 1 M NaOH, 0°	30 ** 5 **	57 58

\* Реакции проводились в условиях псевдотермического гидролиза.

\*\* Время полного гидролиза.

\*\*\* Сокращения даны по [33], однако во избежание грешечности формул скобки для заместителя по 5'- и 3'-гидроксильным группам опущены. В олигопиримидолиде X(Y)R(Z): В — нуклеозид; p — остаток фосфорной кислоты в 3'-положении; X — заместитель в 5'-положении; (Y) — заместитель в 2'-положении; (Z) — заместитель по фосфатной группе; а — заместитель по аминогруппе гетероциклического основания. Например, (MeO)<sub>2</sub>TtA(Thrp)(CNEt)U(Bz)Bz — N<sup>6</sup>-ацетил-5'-O-димеритрил-2'-O-тетрагидропиримидинил-(3'-5')-2'-3'-ди-O-бензоилуридин-Р-(β-цианэтилового) эфир).

\*\*\*\* Подготовляется разбавлением в два раза метанола, насыщенного аммиаком при 0°.

видом, имеющим свободную 5'-ОН-группу; 2) нуклеозид-5'-фосфат конденсируют с нуклеозидом, имеющим свободную 3'-ОН-группу. Таким образом, для синтеза олигорибонуклеотидов необходимы соответственно защищенные нуклеозиды со свободными 3'-ОН- или 5'-ОН-группами (нуклеозидная компонента) и нуклеотиды с остатками фосфорной кислоты в положениях 5' или 3' (нуклеотидная компонента). При этом для защиты 2'-ОН-группы используются как щелочнолабильные (ацильные), так и кислотолабильные (ацетальные и кетальные) группы. Наиболее распространен первый вариант синтеза вследствие большей доступности исходных соединений.

Нуклеозид-3'-фосфаты могут быть получены с помощью различных рибонуклеаз из нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Нуклеозиды со свободной 5'-ОН-группой можно получить, с одной стороны, используя способность *цис*-гликольной группировки рибозы образовывать циклические кетали, ацетали и ортоэфиры кислот, с другой — посредством тритилирования первичной гидроксильной группы с последующим ацилированием и детритилированием. Синтез производных нуклеозидов, имеющих свободную 3'-ОН-группу, связан с большими трудностями из-за отсутствия селективных методов защиты 2'-ОН-группы.

## 2. Диэфирный метод синтеза олигорибонуклеотидов на основе 3'-нуклеотидов

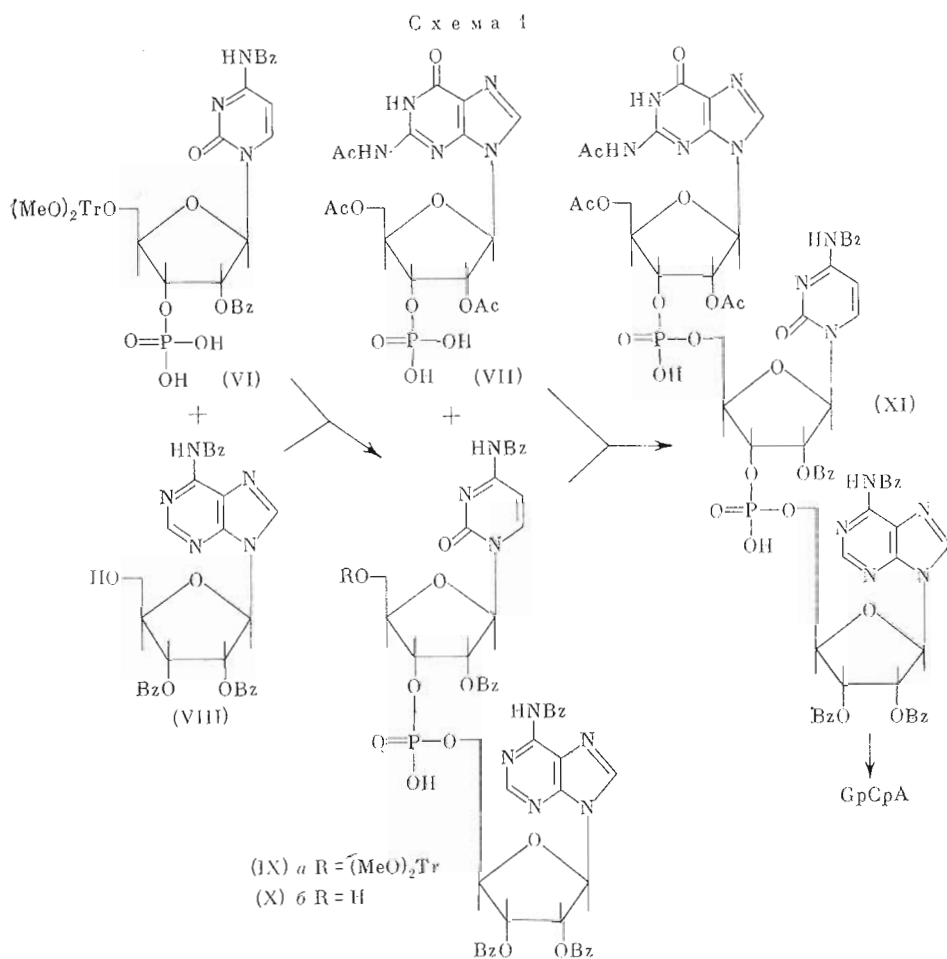
### *Применение щелочнолабильных группировок для защиты 2'-гидроксильной группы в 3'-нуклеотиде*

Для защиты 2'-ОН-группы применяют щелочнолабильные ацильные группы (обычно ацетильную и бензоильную). При ацилировании нуклеозид-3'-фосфатов в стандартных условиях ангидридами и хлорангидридами органических кислот в пиридине происходит преимущественное образование нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Поэтому был разработан новый метод ацилирования с использованием ацетата или бензоата тетраэтил-аммония. В этом случае удается получить производные 2'-О-ацилнуклеозид-3'-фосфата с высокими выходами [59—64]. При бензоилировании образуются устойчивые бензоилфосфаты, которые не гидролизуются водным пиридином, как ацетилфосфаты [59]. Разрушение бензоилфосфатов достигается обработкой уксусным ангидридом в пиридине с последующим гидролизом водным пиридином [59, 61]. Полученные таким образом полностью ацилированные нуклеозид-3'-фосфаты использовали в качестве нуклеотидных компонент для конденсации с 2',3'-О-(2,4-диметоксибензилиден)- или 2',3'-О-(*n*-диметиламинобензилиден)-нуклеозидами [41, 65, 66], которые получали из нуклеозидов и соответствующих ароматических альдегидов в присутствии кислотных катализаторов. После мягкого щелочного и кислотного гидролиза получали динуклеозидмонофосфаты. В качестве нуклеозидной компоненты применяли также 2',3'-ди-О-ацилнуклеозиды [64].

Для дальнейшего наращивания цепи необходимы условия, в которых 5'-гидроксильную группу промежуточного, полностью защищенного динуклеозидфосфата можно было деблокировать, а остальные защитные группы оставить незатронутыми. Такой частично защищенный динуклеозидфосфат со свободной 5'-ОН-группой может быть использован в качестве нуклеозидной компоненты при дальнейшем синтезе. Именно этот путь избрали Корана с сотрудниками для получения всех возможных 64 тринуклеозиддифосфатов [59] (схема 1).

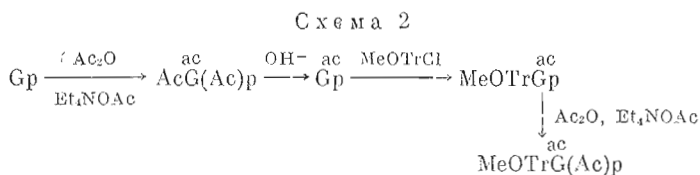
Для синтеза тринуклеозиддифосфатов были использованы следующие компоненты: 5'-О-диметокситритильные производные ацилированных 3'-нуклеотидов (VI), полностью ацилированные 3'-нуклеотиды (VII) и ацилированные производные нуклеозидов со свободной 5'-ОН-группой (VIII). Конденсация соединений (VI) и (VIII) в присутствии дицикло-





гексилкарбодимида или триизопропилбензолсульфохлаорида с последующим кислотным гидролизом для удаления диметокситритильной группы приводила к образованию соединения (X), которое конденсировали со второй нуклеотидной компонентой (VII), получая полностью ацилированный тринуклеозиддифосфат (XI). После снятия ацильных защит получали тринуклеозиддифосфаты [59, 60, 67].

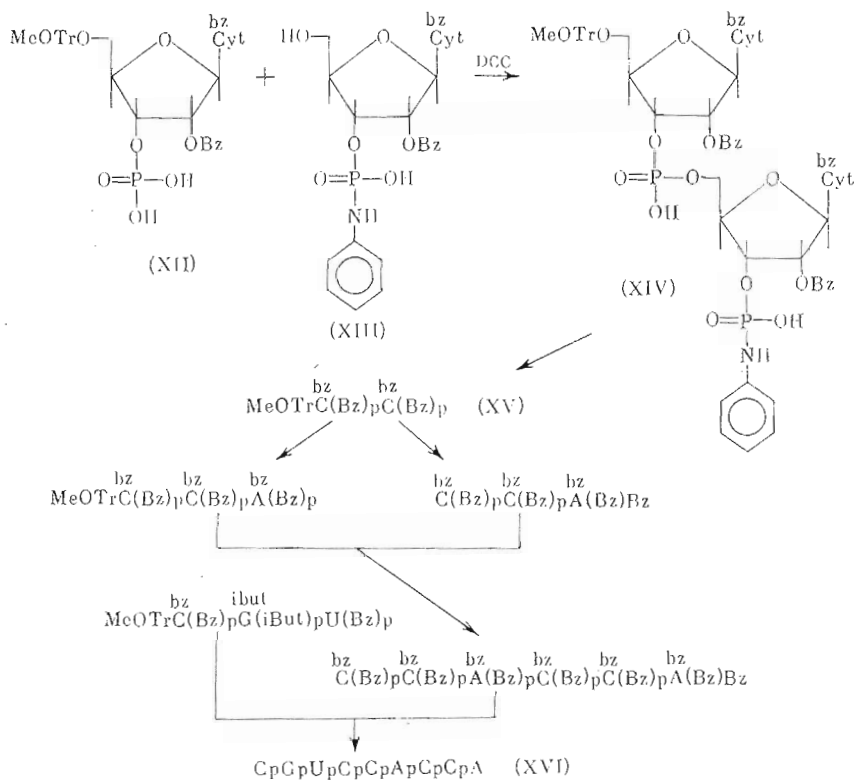
Ключевым соединением в синтезе по схеме 1 являются 5'-О-диметокситритильные производные нуклеозид-3'-фосфатов (VI), которые обычно получают прямым тритилированием 3'-нуклеотидов [60—62], а также тритилированием нуклеозид-2',3'-циклофосфатов с последующим ферментативным гидролизом панкреатической рибонуклеазой А (в случае производных уридина и цитидина) и ацилированием в присутствии солей тетраэтиламмония [59]. Этим методом можно получать как соединения типа (VI), так и соединения типа (VII). В последнем случае ацилируют нуклеозид-3'-фосфаты [63, 64]. Для синтеза N<sup>2</sup>-ацетил-5'-О-диметокситритил-2'-О-ацетилгуанозин-3'-фосфата использовали также схему 2 [59].



Синтез N-ацильных производных с помощью полного ацилирования с последующей щелочной обработкой является практически единственным возможным методом синтеза селективно защищенных по аминогруппам производных аденозина и гуанозина [25, 26]. В случае производных цитидина возможно селективное ацилирование аминогруппы гетероциклического основания [25, 26, 67, 68]. N-Ацил-2', 3'-ди-O-ацилнуклеозиды обычно получают тритилированием свободных нуклеозидов с последующим полным ацилированием и удалением тритильной группы в кислой среде [34, 64, 69]. Для предотвращения образования N-тримильных производных можно предварительно блокировать аминогруппы гетероциклов с помощью ацеталей диметилформамида [70].

Аналогичным образом, используя фениламидную защитную группу, Икехара с сотрудниками синтезировали нонануклеотид (XVI) [71] (схема 3).

С х е м а 3

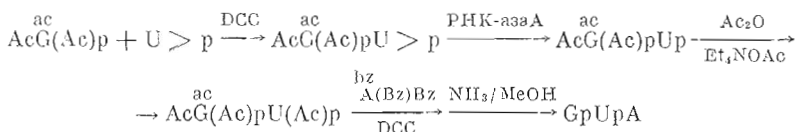


Защиту с фосфатной группы селективно удаляли действием изоамила нитрита в смеси пиридин — уксусная кислота, 1 : 1 (см. таблицу). При этом как кислотолабильные, так и щелочнолабильные защитные группы не затрагивались. Полученное соединение (XV) вводили в реакцию с соединениями типа (XIII) и после удаления фениламидной группы получали полностью защищенные тринуклеотиды [55, 72], конденсация которых после удаления защитных групп приводила к нонануклеотиду (XVI).

Необходимо отметить, что образующийся при конденсации соединений (XII) и (XIII) после частичного деблокирования динуклеотид (XV) является в свою очередь нуклеотидной компонентой для дальнейшего синтеза в отличие от соединения (X) (см. схему 1), представляющего собой нуклеозидную компоненту.

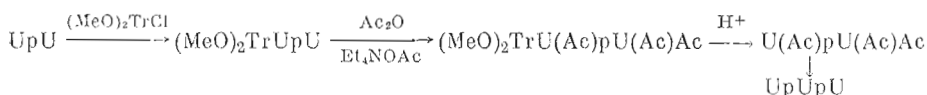
Другой вариант синтеза 3'-фосфатдинуклеозидфосфатов — использование рибонуклеаз для гидролиза производных нуклеозид-2',3'-циклофосфатов [71—75]. Таким способом были синтезированы тринуклеозиддифосфаты [75] (схема 4).

Схема 4



Разработанные методы селективного тритилирования с последующим ацилированием были применены для синтеза олигонуклеотидов на основе динуклеозидфосфатов [76] (схема 5).

Схема 5



*Применение кислотолабильных группировок для защиты 2'-гидроксильной группы в 3'-нуклеотиде*

Известно, что эфиры 3'-нуклеотидов в кислой среде не только гидролизуются, но и изомеризируются в эфиры 2'-нуклеотидов; гидролиз в щелочной среде не сопровождается такой изомеризацией [16, 25, 77].

Стабильность межнуклеотидной связи в кислой среде была изучена на примере уридил-3'(—5')-уридина, который выдерживали 216 ч в 0,01 н. HCl при 25°. В результате до уридил-2'(—5')-уридина изомеризовалось менее 1% исходного соединения, а расщепление межнуклеотидной связи с образованием уридина и уридин-2' (3')-фосфата составляло лишь 0,5% [16, 35]. В этих условиях происходит количественное снятие кислотолабильных группировок, применяемых в синтезе олигорибонуклеотидов для защиты 2'-гидроксильной группы — тетрагидропиранильной, метокситетрагидропиранильной, этоксиэтильной (см. таблицу).

Тetraгидропиранильная защитная группа, которая впервые была использована Смортом и Шормом [78] и Кораной с сотр. [34, 79], наиболее часто используется для синтеза. Для ее введения используется кислотокатализируемая реакция 3'-нуклеотида с дигидропираном. Так, из уридин-3'-фосфата и уридин-3',5'-циклофосфата получали соответственно 5',2'-ди-О-тетрагидропиранилуридин-3'-фосфат [69] и 2'-О-тетрагидропиранилуридин-3',5'-циклофосфат [34]. Гидролиз последнего соединения гидроокисью бария при 100° давал 2'-О-тетрагидропиранилуридин-3'-фосфат и 2'-О-тетрагидропиранилуридин-5'-фосфат в соотношении 5 : 1. После тритилирования этой смеси и разделения получали 5'-О-диметокситригил-2'-О-тетрагидропиранилуридин-3'-фосфат [34]. Соединения этого типа могут быть использованы для синтеза динуклеозидмонофосфатов, тогда как для получения олигонуклеотидов лучше использовать 5'-О-ацильные производные, в которых 5'-ОН-группа может быть селективно деблокирована в щелочной среде. Так, исходя из уридин-2',3'-циклофосфата после ацилирования и раскрытия пятичленного фосфатного цикла с помощью панкреатической рибонуклеазы и последующей реакции с дигидропираном был получен 5'-О-ацетил-2'-тетрагидропиранилуридин-3'-фосфат [78]. Аналогичные производные дигидина, аденозина и гуанозила были синтезированы с помощью рибонуклеазы А, рибонуклеазы T<sub>1</sub> и рибонуклеазы T<sub>2</sub> [80—82]. Вместо тетрагидропиранильной защитной группы при этом применяли этоксиэтильную группу, которая удаляется

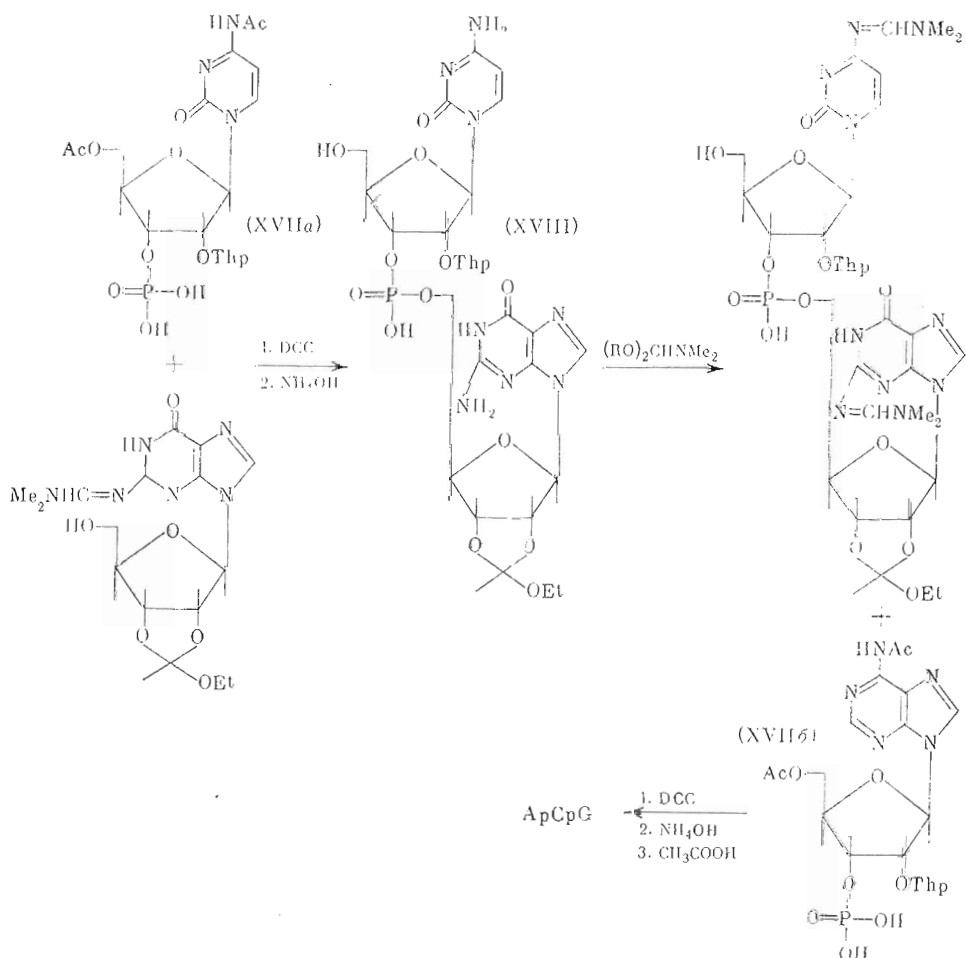
в еще более мягких условиях (см. таблицу). 5'-О-Ацил-2'-О-этоксипропиленнуклеозид-3'-фосфаты были получены аналогичным образом [38, 40, 83].

Нуклеозидные компоненты получали кислотокатализируемой реакцией рибонуклеозидов с альдегидами, кетонами и эфирами ортокислот. Наиболее часто использовали циклопентилиденую [84, 85], *n*-метоксибензилиденую [34, 85, 86], *n*-диметиламинобензилиденую [41, 65, 87], 2,4-диметоксисбензилиденую [41, 65, 88] и этоксиметилиденую [40, 89, 90] защитные группы. Гетероциклические аминогруппы при этом защищались ацильными [85] или диметиламинометиленовой защитными группами. Последняя защитная группа легко вводится с помощью ацеталей диметилформаида [90—93]. Диметиламинометиленовая защита легко удаляется кипячением в этаноле или разбавленным водным аммиаком [90].

При обработке производных нуклеозидов диметилацеталем диметилформаида побочно проходит метилирование гетероциклических оснований [92, 94]. Этого можно избежать, применяя динеопентилловый ацеталь диметилформаида [92].

С помощью описанного выше метода был синтезирован ряд олигорибонуклеотидов [81, 85—87, 92, 95—99]. Один из синтезов представлен на схеме 6 [82]. Частично защищенные динуклеозидфосфаты типа (XVIII) были получены с выходами 30—50%, а триплеклеозиддифосфаты—с выходами 10—20%.

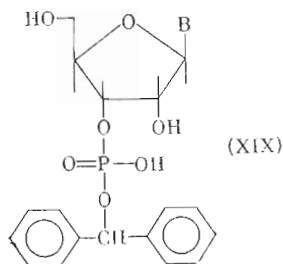
Схема 6



Оба подхода к синтезу олигорибонуклеотидов, с использованием щелочнолабильных или кислотолабильных защит 2'-ОН-группы в 3'-нуклео-

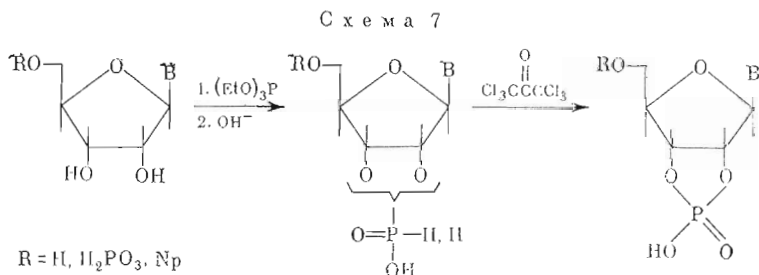
тидах, принципиально сходны: 2'-гидроксил и 2',3'-*цис*-гликольная группировка защищены одним типом защитных групп, в то время как для блокирования 5'-гидроксила в нуклеотидной компоненте используется другая защитная группа, которую можно селективно удалить без затрагивания защит по остальным гидроксильным группам в динуклеозидфосфатах (X) и (XVIII) (см. схемы 1 и 6).

Интересный метод синтеза динуклеотидов был предложен Крамером с сотр. Соединения типа (XVII) конденсировали в присутствии дициклогексилкарбодимида с бензгидрильными эфирами 3'-нуклеотидов (XIX) [65, 66, 100—103].



После удаления защитных групп были получены 3'-динуклеотиды (бензгидрильная группа удаляется кислотным гидролизом, см. таблицу). Соединения (XIX) получали обработкой 3'-нуклеотидов дифенилдиазометаном [100, 102]. Использование объемного заместителя в фосфатном остатке пространственно защищает как 2'-ОН-группу, так и фосфатный остаток.

Наряду с этим методом для синтеза 3'-динуклеотидов пользуются гидролизом динуклеозидфосфат-2',3'-циклофосфатов рибонуклеазами, а также методами, описанными ранее (см. схемы 3 и 4). Кроме того, возможно селективное фосфорилирование 2',3'-*цис*-гликольной группировки триэтилфосфитом в присутствии кислот. Последующий мягкий щелочной гидролиз с образованием 2',3'-фосфитных производных и окислительная циклизация гексахлорацетоном приводит к нуклеозид-2',3'-циклофосфатам [105—107] (схема 7).



### 3. Диэфирный метод синтеза олигорибонуклеотидов на основе 5'-нуклеотидов

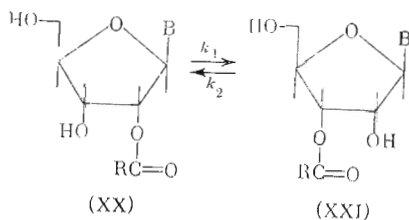
Использование в качестве нуклеотидной компоненты 5'-нуклеотидов предполагает защиту 5'- и 2'-гидроксильных групп в нуклеозидной компоненте. Синтез подобных соединений связан с большими трудностями из-за отсутствия прямых методов селективного введения защитных групп в 2'-положение. Для защиты 2'-ОН-группы использовали щелочнолабильные (ацетальные), кислотолабильные (ацетальные и кетальные), а также бензильную защитную группу, которая удаляется гидролизом. Применение бензильных эфиров в олигорибонуклеотидном синтезе [108] не нашло широкого применения, поскольку удаление этой защитной груп-

пы обычно сопровождается побочным гидрированием 5,6-двойной связи в пиримидиновых нуклеозидах [109]. Кроме того, получение 2'-бензильных производных аденозина и гуанозина весьма затруднительно.

*Применение щелочнолабильных группировок для защиты  
2'-гидроксильной группы в нуклеозидной компоненте*

Известно, что в 1,2-диольной системе ацильные остатки легко мигрируют [110, 111]. Поэтому применение ацильных защитных групп для 2'-гидроксидов сдерживалось отсутствием кинетических данных о скоростях миграции в условиях синтеза межнуклеотидной связи и отсутствием удобного и достоверного способа определения положения ацильной группы. Недавно были разработаны методы определения места заместителя в *цис*-гликольной группе рибонуклеотидов [112, 113] и показано, что каждый из изомеров может быть превращен в равновесную смесь обоих [114]. Во всех рассмотренных случаях отмечена большая стабильность 3'-изомера (XXI) ( $B =$  урацил;  $R = H, CH_3, Ph$ ), причем константа равновесия  $k_1/k_2$  равнялась 1,5—2,0.

Схема 8



В абсолютном пиридине при 60° константы скорости установления равновесия ( $k_1 + k_2$ ) бензоильной, ацетильной и формильной групп относятся соответственно как 1 : 18 : 670 [114]. Они увеличиваются при добавлении воды [115].

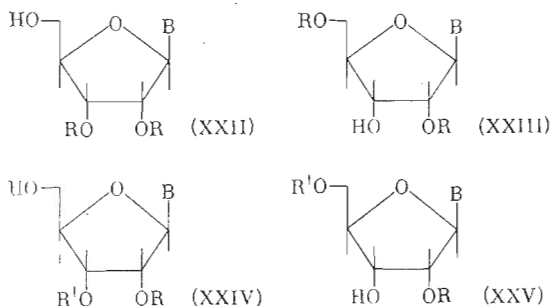
Первые попытки применения 2'-О-ацильных производных не дали обнадеживающих результатов. Так, фосфорилирование  $\beta$ -цианэтилфосфатом или  $N^6$ -ацетил-2',3'-ди-О-ацетиладенозин-5'-фосфатом в присутствии динуклеотидкарбодимидов после деблокирования привело к образованию смеси 3'- и 2'-изомеров [69]. Однако недавно была показана возможность применения ацильных защит для 2'-ОН-групп. Так, в абсолютном пиридине при 20° 5',2'-ди-О-анизолуридин изомеризуется только на 5% за 5 сут [114]. В этих же условиях фосфорилирование с помощью хлорангидридов ароматических сульфокислот протекает за несколько часов; следовательно, такой подход к синтезу олигорибонуклеотидов при использовании *n*-анизольной и бензоильной защит вполне возможен. Исходя из  $N^2$ -бензоил-5',2'-ди-О-бензоилгуанозина и 2',3'-ди-О-ацетилауридин-5'-фосфата был синтезирован динуклеозидфосфатуапилил-(3'—5')-уридин, который количественно гидролизировался рибонуклеазой  $T_1$  [115]. Использование в качестве нуклеозидной компоненты  $N^4$ -ацетил-5',2'-ди-О-ацетилцитидина после деблокирования привело к цитидилил-(3'—5')-уридину, который гидролизировался панкреатической рибонуклеазой А на 98%, т. е. это соединение содержало 2% изомерного цитидилил-(2'—3')-уридина [115].

*Применение кислотолабильных группировок для защиты  
2'-гидроксильной группы в нуклеозидной компоненте*

Этот подход к олигорибонуклеотидному синтезу, разработанный в лаборатории Риса, на наш взгляд, один из наиболее фундаментальных. Для его реализации необходимо иметь два типа производных для каждо-

го нуклеозида: «оканчивающие» 2',3' и 2',5' (XXII), (XXIII) и «продолжающие» 2',3' и 2',5' (XXIV), (XXV) мономерные единицы [16] (схема 9).

С х е м а 9



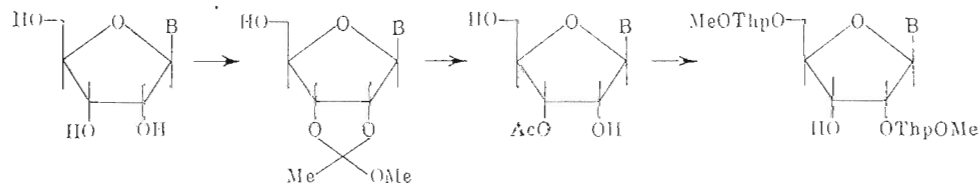
R — кислотолабильная защитная группа,  
R' — щелочнолабильная защитная группа.

Для защиты *цис*-гликольной группы в рибонуклеозидах была использована метоксиметилиденовая группировка [42, 116, 117]. Производные (XXII) с такой группой получали с высокими выходами, используя кислотокатализируемую реакцию рибонуклеозидов с триметилортоформатом [42, 116]. В кислой среде 2',3'-O-метоксиметилиденинуклеозиды легко гидролизуются (см. таблицу), образуя смесь 2'- и 3'-формильных эфиров нуклеозидов. Формильная группа легко удаляется при pH 7 [42]. Аналогичным образом рибонуклеозиды реагируют с триметилортоацетатом и -ортобензоатом, давая 2',3'-O-метоксиэтилиден- и метоксибензилиденинуклеозиды, мягкий кислотный гидролиз которых приводит к смесям 2'- и 3'-ацетатов и бензоатов, из которых можно выделить 3'-изомер в кристаллическом виде [44].

Кислотокатализируемая реакция 3'-O-ацилнуклеозидов с дигидропираном с последующим гидролизом раствором аммиака в метаноле дает соединения типа (XXIII). Однако, как отмечалось ранее, применение тетрагидропиранильной группы связано с одним существенным недостатком: при образовании тетрагидропиранильных производных возникает новый асимметрический атом углерода, что приводит к смеси диастереомеров [35]. В случае 2'-O-тетрагидропиранилнуклеозидов удалось разделить эти два диастереомера, тогда как для бистетрагидропиранильных производных получающиеся четыре диастереомера разделены не были [16].

Поскольку для олигорибонуклеотидного синтеза желательно иметь чистые кристаллические мономерные производные, были предложены симметричные кислотолабильные защиты: метоксициклогексильная [36], 4-метокситетрагидропиранильная [36, 118] и 4-метокситетрагидропиранильная [37] (см. таблицу). Лучшей защитной группой оказалась 4-метокситетрагидропиранильная, которая вводится при взаимодействии производных нуклеозидов с 4-метоксидигидропираном. С использованием этой группы по схеме 10 были получены соединения типа (XXIII) из 3'-O-ацетилнуклеозидов [119].

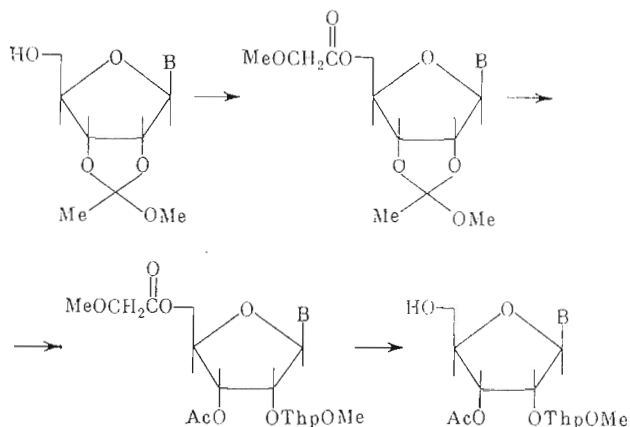
С х е м а 10



B = урацил, N<sup>1</sup>-бензоилцитозин, аденин, N<sup>2</sup>-бензоилгуанин.

Разработанный метод селективного ацилирования *цис*-гликольной группы рибонуклеозидов с помощью ортоэфиров карбоновых кислот был применен для синтеза соединений типа (XXIV) [45, 120] (схема 11).

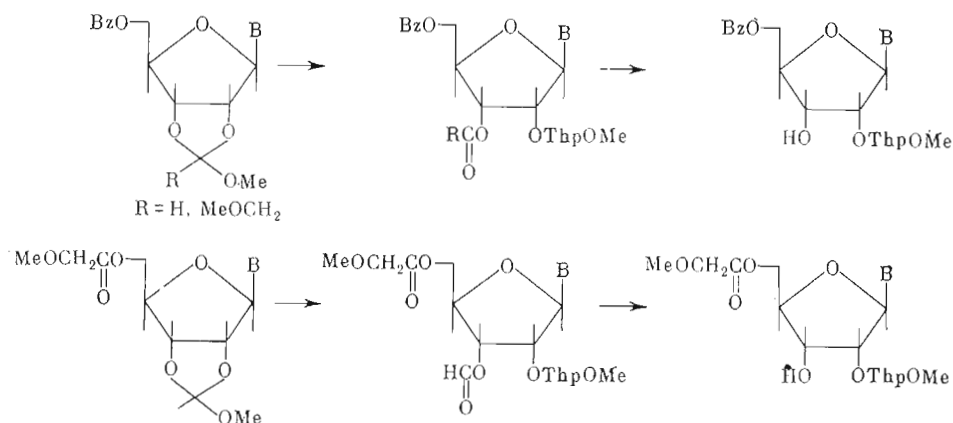
С х е м а 11



Ацилирование метоксиуксусным ангидридом 2',3'-О-метоксиэтилиденнуклеозидов с последующим кислотным гидролизом приводило после разделения изомеров к 5',3'-ди-О-ацилпроизводным. Последние обрабатывали 4-метоксидигидропираном и после селективного удаления метоксиацетильной защиты (см. таблицу) выделяли 2'-О-метокситетрагидропиранил-3'-О-ацетил(N-защищенные)нуклеозиды в кристаллическом виде.

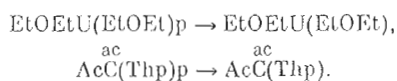
Синтез соединений типа (XXV) был осуществлен селективным ацилированием пивалоилхлоридом 2'-О-тетрагидропиранилнуклеозидов [35, 117], а также селективным деацилированием 5',3'-ди-О-ацил-2'-О-тетрагидропиранилнуклеозидов [121] (схема 12).

С х е м а 12



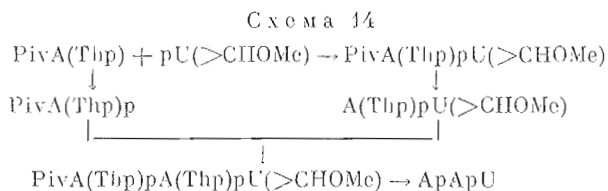
Соединения типа (XXIII) и (XXV) получали также дефосфорилированием щелочной фосфатазой соответствующих 3'-фосфатов [122, 123] (схема 13).

С х е м а 13



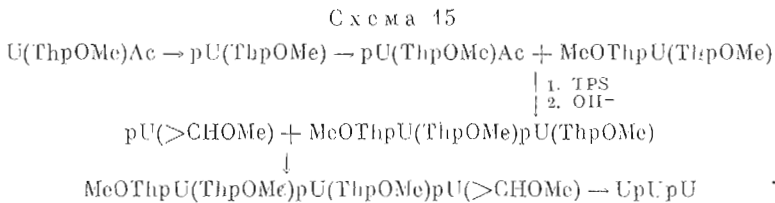


Фосфорилирование 2',3'-О-метоксиметилиденнуклеозидов β-цианэтилфосфатом в присутствии дициклогексилкарбодимиды с последующим щелочным гидролизом приводило к 2',3'-О-метоксиметилиденнуклеозид-5'-фосфатам [42]. Эти соединения использовали в качестве нуклеотидной компоненты в конденсации с 5'-О-пивалоил-2'-О-тетрагидропиранилнуклеозидами [35, 124]. После снятия пивалоильной защиты динуклеозидфосфаты использовали для получения динуклеотидов и тринуклеозиддифосфатов [124] (схема 14).



Использование соединений типа (XXV) для синтеза 3'-фосфатов и применение последних в качестве нуклеотидной компоненты показывает универсальность подхода к синтезу олигорибонуклеотидов, разработанного в лаборатории Риса.

Тринуклеозиддифосфаты можно также получить, исходя из соединений типа (XXIII) и (XXIV) [125] (схема 15).



Фосфорилирование 3'-О-ацетил-2'-метокситетрагидропиранилуридина β-цианэтилфосфатом в присутствии дициклогексилкарбодимиды после щелочного гидролиза и ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине давало 3'-О-ацетил-2'-О-метокситетрагидропиранилуридин-5'-фосфат, который использовался в качестве нуклеотидной компоненты для конденсации с соединениями типа (XXIII) в присутствии триэтилопропилбензолсульфохлорида. После снятия 3'-О-ацетильной защиты с полученного динуклеозидфосфата, второй конденсации с 2',3'-О-метоксиметилиденуридин-5'-фосфатом и кислотного гидролиза был получен тринуклеозиддифосфат.

#### 4. Триэфирный метод синтеза олигорибонуклеотидов

В последнее время ряд исследователей, работающих в области олигорибонуклеотидного синтеза, стали отдавать предпочтение триэфирному методу синтеза олигонуклеотидов.

Особенностью вышеописанного диэфирного метода является то, что диэфирный остаток фосфорной кислоты при последующих реакциях фосфорилирования и конденсации остается незащищенным. Это приводит к тому, что, во-первых, анион диалкилфосфата может активироваться под действием конденсирующих агентов и вызывать тем самым побочные реакции; во-вторых, частично защищенные промежуточные соединения практически не растворимы в органических растворителях и, для того чтобы их выделить в чистом виде, необходимы весьма трудоемкие операции. Эти недостатки можно преодолеть, используя защиту фосфатного остатка. Однако такая защитная группа должна удовлетворять очень жестким критериям: она должна быстро удаляться без какой-либо дегра-

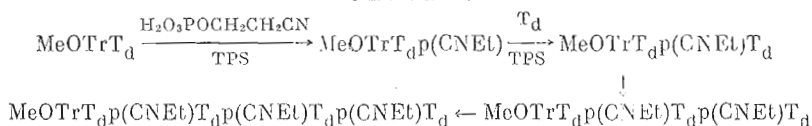
дации межнуклеотидной связи и быть устойчивой при селективном снятии защитных групп с сахарных остатков при дальнейшем наращивании олигонуклеотидной цепи.

Наряду с очевидными преимуществами триэфирного метода (защита фосфатной группы; возможность быстрого выделения промежуточных продуктов с помощью адсорбционной хроматографии на силикагеле в органических растворителях; возможность получения олигонуклеотидов в больших количествах — 1—10 г) этот метод имеет и ряд недостатков: 1) скорость конденсации диэфира фосфорной кислоты с нуклеозидной компонентой примерно на порядок меньше, чем скорость конденсации моноэфира фосфорной кислоты; 2) применение еще одной защитной группы затрудняет выбор защитных групп гетероциклических оснований и сахарных остатков.

Впервые синтез природного динуклеозидфосфата тимидил-(3'—5')-тимидина был осуществлен триэфирным методом [126]. Взаимодействие 5'-О-ацетилтимидин-3'-бензилхлорфосфата с 3'-О-ацетилтимидином после удаления бензильной защиты гидрогенолизом, а ацетильной — обработкой щелочью дало искомое соединение. Дальнейшее развитие триэфирного метода также связано с получением олигодезоксирибонуклеотидов [127—133]. Олигонуклеотидный синтез в дезоксирияду существенно проще рибонуклеотидного, поэтому он является своеобразным полигоном, на котором проверяются новые идеи, принципы, конденсирующие агенты и защитные группы, которые впоследствии применяются в олигорибонуклеотидном синтезе.

Было показано, что конденсация 5'-О-монометокситритилтимидин-3'-(β-цианэтил)фосфата с незащищенными (по сахарному остатку) нуклеозидами в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида после деблокирования приводит к образованию динуклеозидфосфатов с высокими выходами. Эти соединения содержали 5—10% изомера с неестественной 3'—3'-связью [129—131]. При дальнейшем наращивании олигонуклеотидной цепи выходы существенно не уменьшались и составляли ~50% [129—131] (схема 16).

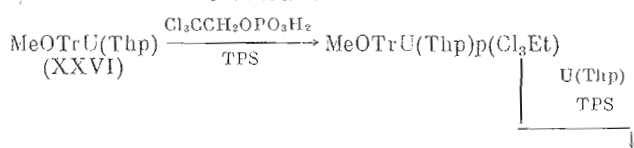
Схема 16



Использование в качестве нуклеотидной компоненты 3'-О-ацетил-тимидин-5'-(β-цианэтил)фосфата в конденсации с 5'-О-монометокситритилтимидином не дало хороших результатов [131]. На примере синтеза олигодезоксирибонуклеотидов была показана возможность использования в качестве конденсирующих агентов также эфиров дихлорфосфорной кислоты [15—17, 133].

Первые же работы в области олигорибонуклеотидного синтеза продемонстрировали возможность применения в качестве нуклеозидной компоненты 2'-защищенных производных нуклеозидов со свободной 3'-ОН-группой [134, 135] (схема 17).

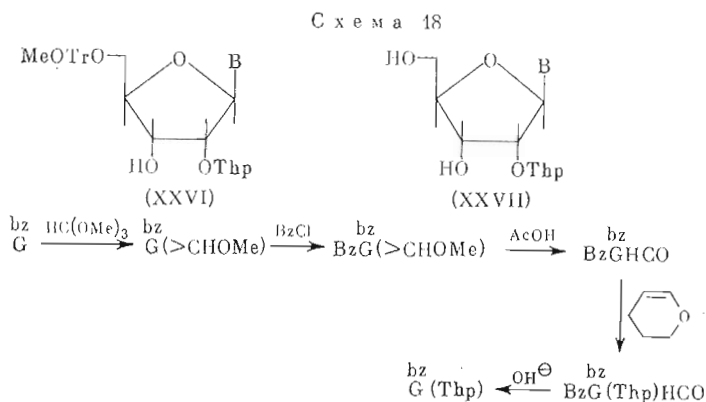
Схема 17



Соединение (XXVI) было получено тритилированием 2'-О-тетрагидропиранилнуклеозидов [136, 137]. Выходы на стадиях конденсации состав-

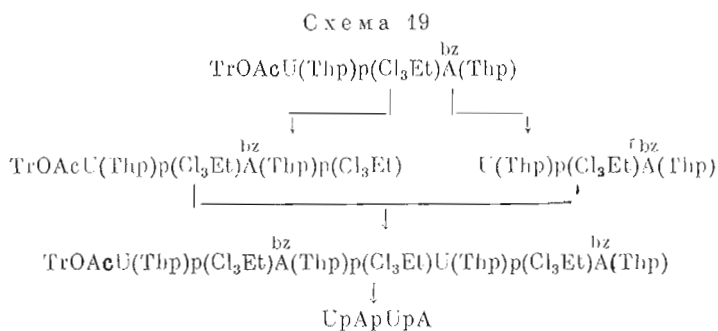
ляли более 60%. Тришуклеозиддифосфат, полученный после снятия трихлорэтильной и кислотолабильных защит сначала обработкой цинк-медной парой в диметилформамиде, а затем 0,01 н. HCl (см. таблицу), полностью гидролизался панкреатической рибонуклеазой А, что свидетельствовало об отсутствии примесей с неприродными межнуклеотидными связями (2'—5' и 3'—3').

В качестве нуклеотидных компонент использовали соединения (XXVI), фосфорилированные  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтилфосфатом в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида; в качестве нуклеозидных — соединения (XXVII) [136—138] (схема 18).



B = урацил, N<sup>4</sup>-бензоилцитозин, N<sup>6</sup>-бензоиладенин, N<sup>2</sup>-бензоилгуанин.

Так, N<sup>2</sup>-бензоил-2'-О-тетрагидропиранилгуанозин получали из N<sup>2</sup>-бензоилгуанозина при помощи метилортоформиата [138]. Для блокирования 5'-ОН-группы использовали также трифенил-метоксиацетиловую защиту, которую селективно удаляли в мягких щелочных условиях без затрагивания ациламидных групп гетероциклических оснований [138—140]. Применение ее позволило осуществить блочный синтез тетрашуклеотида с высоким выходом [139] (схема 19).



Реакция 2'-О-тетрагидропиранилуридина с трифенилметоксиуксусной кислотой в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида приводила к образованию соединения типа (XXVI), которое фосфорилировали  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтилфосфатом и конденсировали с N<sup>6</sup>-бензоил-2'-тетрагидропираниладенозином, получая исходный динуклеозидфосфат. Повторное фосфорилирование и конденсация с динуклеозидфосфатом, имеющим свободную 5'-ОН-группу, давало тетрашуклеотид. Аналогичным образом Нельсон с сотрудниками получили понашуклеотид [141].

Использование различных тритильных защитных групп увеличивает растворимость производных нуклеозидов и нуклеотидов в органических растворителях, помогая детектировать эти соединения (обработка хрома-

тограмм растворами хлорной кислоты или сульфата церия окрашивает зоны, содержащие тритильные производные, в красный цвет).

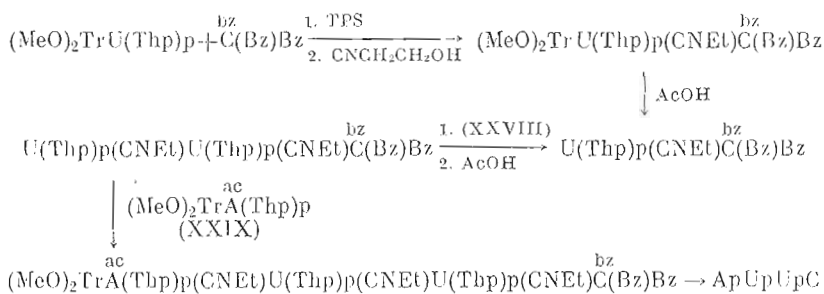
В триэфирном методе синтеза олигонуклеотидов использовали также фенильную защитную группу [16—18, 142—144]. Как и в случае применения  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтильной группы, конденсацию осуществляли с помощью фенилового эфира фосфорной кислоты и триизопропилбензолсульфохлорида [18, 143] или фенилового эфира дихлорфосфорной кислоты в присутствии 5-хлор-1-метилимидазола или 2,6-лутидина в качестве катализаторов [16—18]. В синтезе олигодезоксирибонуклеотидов применение фенилового эфира дихлорфосфорной кислоты дало обнадеживающие результаты, тогда как в синтезе олигорибонуклеотидов значительно перспективнее оказалось применение фенилового эфира фосфорной кислоты и триизопропилбензолсульфохлорида [18]. Удаление фенильной группы осуществляли в 0,1 н. NaOH. При этом был отмечен частичный гидролиз межнуклеотидной связи. Чтобы избежать этого, был предложен ряд замещенных фенильных групп [18, 144], например, *o*-хлорфенильная [18, 144] и *n*-метилтиофенильная [145].

Интересный подход к синтезу олигорибонуклеотидов, так называемый комбинированный метод, был предложен Спртом [146, 147]. Было показано, что обработка полностью защищенного динуклеозидфосфата хлорангидридами ароматических сульфокислот в присутствии спиртов ( $\beta$ -цианэтанол,  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтанол, бензиловый спирт) приводит к триэфирному производному фосфорной кислоты, причем лучшие результаты получаются при использовании  $\beta$ -цианэтанола [148]. На первой стадии осуществляется обычная диэфирная конденсация нуклеотидной и нуклеозидной компонент с помощью триизопропилбензолсульфохлорида, а затем полученный защищенный динуклеозидфосфат без выделения переводится в триэфирное производное фосфорной кислоты обработкой  $\beta$ -цианэтанолом [146, 147]. Использование  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтильной группы не дало удовлетворительных результатов вследствие низкого выхода на стадии деблокирования [148, 149]. Это не соответствует данным Нельсона и сотрудников о практически количественном удалении  $\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтильной группы в близких условиях [137—140].

Применение щелочнолабильной  $\beta$ -цианэтильной группы связано с существенным ограничением использования других щелочнолабильных групп. Так, для защиты 5'-ОН-группы [148] была использована  $\beta$ -бензонпропионильная защитная группа [150], которая удаляется при действии раствора гидразина в смеси пиридин — уксусная кислота, 8:2.

Наиболее широкое применение нашла кислотолабильная диметокситритильная группа, которая селективно удаляется обработкой 90% уксусной кислотой без затрагивания тетрагидропиранильной и  $\beta$ -цианэтильной групп [148]. Таким образом, был осуществлен синтез тетрануклеотида [151] (схема 20).

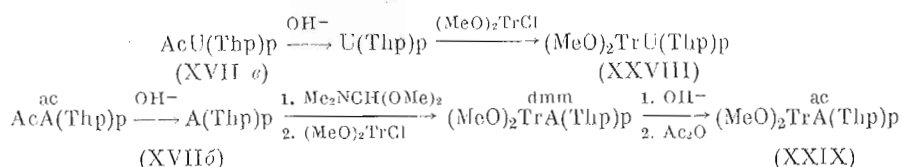
Схема 20



Исходными соединениями при синтезе являлись ацилированные нуклеозиды со свободными 5'-ОН-группами [64] и 5'-О-диметокситри-

тил-2'-О-тетрагидропиранилнуклеозид-3'-фосфаты [147, 151] (XXVIII) и (XXIX), которые получали из 5'-О-ацетил-2'-О-тетрагидропиранилнуклеозид-3'-фосфатов [82, 85] по схеме 21.

Схема 21



Для защиты фосфатной группы в триэфирном методе синтеза применяли бифункциональные производные нуклеотидов, например, бис-β,β,β-трихлорэтиловые [152—154], β-цианэтил-*n*-метилтиофенильные [145], β-цианэтил-β,β,β-трихлорэтиловые [155] эфиры нуклеотидов, а также дианилидаты [156, 157], которые были использованы для блочного синтеза олигонуклеотидов.

### 5. Перспективы развития олигорибонуклеотидного синтеза

Развитие олигорибонуклеотидного синтеза в первую очередь связано с проблемой увеличения выхода на стадии образования межнуклеотидной связи. В этом отношении интересными конденсирующими агентами оказались уже отмеченные выше имидазолиды и триазолиды ароматических сульфокислот [19—22], а также α-оксипиридиновые эфиры нуклеотидов [158—160]. В дальнейшем увеличение выходов позволило бы существенно упростить очистку продуктов реакции с помощью фиксации одного из компонентов на полимерном носителе [9, 25, 161]. Продукт реакции, фиксированный на полимере, можно подвергать дальнейшим превращениям, что значительно упрощает многостадийные синтезы. Такой метод синтеза привлекает в настоящее время все большее внимание, хотя в олигорибонуклеотидном синтезе этот подход еще не нашел широкого применения [162, 163].

В синтезе мономерных единиц усилия исследователей в настоящее время направлены на получение новых защитных групп, применение которых позволило бы упростить выделение продуктов реакций. Так, недавно был предложен ряд гидрофобных защитных групп, позволивших выделять продукты конденсации с помощью экстракции органическими растворителями [164, 165].

Перспективно, на наш взгляд, использование в качестве защитных групп производных различных оснований [166—169], имеющих  $pK_a \approx 7-10$ . Применение таких ароматических соединений, поглощающих в видимой области, также упрощает очистку продуктов реакции.

Решение этих проблем даст возможность в дальнейшем подойти к синтезу таких олигонуклеотидов, как транспортные рибонуклеиновые кислоты и их аналоги.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., Sande van de J. H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 209—217.
2. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 6212—6222.
3. Khorana H. G., Vizsolnyi J. P., Ralph R. K. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 414—418.
4. Jacob T. M., Khorana H. G. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1630—1635.
5. Lohrman R., Khorana H. G. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 829—833.
6. Cramer F., Weimann G. (1960) *Chem. and Ind.*, 46.
7. Cramer F., Baldauf H. J., Kuntzel H. (1962) *Angew. Chem.*, **74**, 77—78.
8. Cramer F. (1966) *Angew. Chem.*, **78**, 186—198.

9. Cramer F. (1969) *Pure and Appl. Chem.*, **18**, 197—221.
10. Cramer F., Wittman R., Daneck K., Weimann G. (1963) *Angew. Chem.*, **75**, 92.
11. Kampe W. (1963) *Angew. Chem.*, **75**, 641.
12. Kampe W. (1963) *Tetrahedron Lett.*, 2133—2136.
13. Mizuno Y., Kobayashi J. (1974) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 997—998.
14. Khorana H. G. (1961) Some recent developments in the chemistry of biological interest, *J. Wiley & Sons Inc.*, N. Y. — London.
15. Eckstein F., Rizk I. (1967) *Angew. Chem.*, **79**, 939.
16. Reese C. B. (1970) *Colloques, Internationaux du C.N.R. S.*, vol. 182, pp. 319—328, Paris.
17. Reese C. B., Saffhill R. (1968) *Chem. Commun.*, 767—768.
18. Boom van J. H., Burgers P. M. J., Owen G. R., Reese C. B., Saffhill R. (1971) *Chem. Commun.*, 869—871.
19. Berlin Yu. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A., Kolosov M. N., Korobko V. G. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 1353—1354.
20. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Чахмачева О. Г., Шипгарова Л. Н. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1121—1129.
21. Katagiri N., Itakara K., Narang S. (1974) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325—326.
22. Itakara K., Katagiri N., Narang S. (1974) *Can. J. Chem.*, **52**, 3689—3693.
23. Weimann G., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4329—4341.
24. Blackburn G. M., Brown M. J., Harris M. R., Shire D. (1969) *J. Chem. Soc. (C)*, 676—683.
25. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибасев В. Н. (1970) *Органическая химия нуклеиновых кислот*, «Химия», М.
26. Женодарова С. М. (1965) *Успехи химии*, XXXIV, 82—102.
27. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 2, вып. 4, 85—96.
28. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 7, вып. 3, 121—125.
29. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 7, вып. 3, 126—131.
30. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Потанов В. К., Резвухин А. И., Туркин С. И., Шабарова Э. А. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 9, вып. 4, 152—155.
31. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1975) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 4, вып. 2, 139—149.
32. Кнорре Д. Г., Левина А. С., Шубина Т. И. (1975) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 7, вып. 3, 118—127.
33. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1974) *Pure and Appl. Chem.*, **40**, 279—290.
34. Smith M., Rammner D. H., Goldberg I. H., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 430—440.
35. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B. (1968) *Tetrahedron*, **24**, 639—662.
36. Reese C. B., Saffhill R., Sulston J. E. (1970) *Tetrahedron*, **26**, 1023—1030.
37. Boom van J. H., Deursen van P., Meeuwse J., Reese C. B. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 766—767.
38. Chladek S., Smrt J. (1964) *Chem. and Ind.*, 1719.
39. Hampton A., Fratantoni J. C., Carroll P. M., Wang S. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 5481—5487.
40. Cramer F., Bar P. P., Rhace H. J., Sanger W., Scheit K. H., Schneider G., Tennigkeit J. (1962) *Tetrahedron Lett.*, 1039—1042.
41. Cramer F., Saenger W., Scheit K. H., Tennigkeit J. (1964) *J. Liebigs Ann. Chem.*, **679**, 156—163.
42. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., Sulston J. E. (1967) *Tetrahedron*, **23**, 2301—2313.
43. Chladek S., Zemlička J., Sorm F. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1785—1802.
44. Fromageot H. P. M., Griffin B. E., Reese C. B., Sulston J. E. (1967) *Tetrahedron*, **23**, 2315—2331.
45. Reese C. B., Stewart J. C. M. (1968) *Tetrahedron Lett.*, 4273—4276.
46. Khorana H. G., Turner A. E., Vizsolyi J. P. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 686—698.
47. Reese C. B., Saffhill R. (1972) *J. Chem. Soc. Perkin, Trans.*, **1**, 2937—2940.
48. Ralph R. K., Khorana H. G. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 2926—2934.
49. Holy A., Zemlička J. (1969) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 2449—2458.
50. Tener G. M. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 159—168.
51. Söll D., Khorana H. G. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 360—367.
52. Freist W., Helbig R., Cramer F. (1970) *Chem. Ber.*, **103**, 1032—1036.
53. Eckstein F. (1965) *Angew. Chem.*, **77**, 912—913.
54. Eckstein F. (1967) *Chem. Ber.*, **100**, 2228—2235.

55. Ohtsuka E., Murao K., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 3441—3445.
56. Cook A. F., Holman M. J., Nussbaum A. L. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 1522—1527.
57. Narang S. A., Bhanot O. S., Goodchild J., Whightman R. H., Dheer S. K. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 6183—6189.
58. Agarwal K. L., Fridkin M., Jay M., Khorana H. G. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 2020—2021.
59. Lohrmann R., Söll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 819—829.
60. Lapidot Y., Khorana H. G. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 3852—3857.
61. Lapidot Y., Khorana H. G. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 3857—3862.
62. Coutsogeorgopoulos C., Khorana H. G. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 2926—2932.
63. Rammler D. H., Lapidot Y., Khorana H. G. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1989—1997.
64. Lohrman R., Khorana H. G. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 4188—4194.
65. Cramer F., Rhaese H. J., Rittner S., Scheit K. H. (1965) *Ann.*, **683**, 199—211.
66. Cramer F., Schneider G. (1968) *J. Liebigs Ann. Chem.*, **717**, 193—197.
67. Golankiewicz K., Antkowiak J. (1974) *Acta biochim. pol.*, **21**, 17—22.
68. Otter B. A., Fox J. J. (1968) in *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., eds.), vol. 1, pp. 285—287, Interscience Publ., N. Y.—London—Sydney—Toronto.
69. Rammler D. H., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 3112—3122.
70. Zemlička J., Holy A. (1967) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 3159—3168.
71. Ohtsuka E., Ubasawa M., Morioka S., Ikehara M. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 4725—4733.
72. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikehara M. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 2296—2301.
73. Rhaese H. J., Siehr W., Cramer F. (1967) *Ann.*, **703**, 215—224.
74. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 3445—3451.
75. Ohtsuka E., Tagawa H., Ikehara M. (1971) *Chem. and Pharm. Bull.*, **19**, 139—142.
76. Smrt J. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 1462—1473.
77. Brown D. M., Magrath D. I., Neilson A. H., Todd A. R. (1956) *Nature*, **177**, 1124—1126.
78. Smrt J., Šorm F. (1962) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 73—85.
79. Smith M., Khorana H. G. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 2911—2912.
80. Smrt J., Šorm F. (1963) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 61—71.
81. Brimacombe R., Kemper W., Jaouni T., Smrt J. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 2074—2086.
82. Holy A. (1970) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **35**, 3686—3711.
83. Smrt J., Chladek S. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 2978—2984.
84. Chladek S., Smrt J. (1963) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 1301—1308.
85. Chladek S., Smrt J. (1964) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 214—233.
86. Smrt J. (1964) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 2049—2059.
87. Cramer F., Rittner S. (1964) *Tetrahedron Lett.*, 107—112.
88. Kathawala F., Cramer F. (1967) *Ann.*, **709**, 185—190.
89. Zemlička J. (1964) *Chem. and Ind.*, 581.
90. Zemlička J., Chladek S., Holy A., Smrt J. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 3198—3212.
91. Zemlička J. (1963) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 1060—1062.
92. Holy A., Smrt J. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 3800—3816.
93. Holy A., Smrt J., Šorm F. (1967) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 2980—2997.
94. Holy A., Zemlička J. (1969) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 3921—3935.
95. Smrt J., Šorm F. (1963) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 887—897.
96. Smrt J., Šorm F. (1964) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 2971—2979.
97. Holy A., Smrt J., Šorm F. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 3809—3822.
98. Smrt J. (1969) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 1702—1708.
99. Smrt J., Cramer F. (1970) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **35**, 1456—1463.
100. Cramer F., Scheit K. H. (1962) *Angew. Chem.*, **74**, 387.
101. Cramer F., Scheit K. H. (1962) *Angew. Chem.*, **74**, 717.
102. Cramer F., Scheit K. H. (1964) *Liebigs Ann. Chem.*, **679**, 150—155.
103. Cramer F., Scheit K. H., Rhaese H. J. (1966) *J. Liebigs Ann. Chem.*, **693**, 244—248.
104. Holy A., Smrt J. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1528—1534.
105. Holy A., Pischel H. (1967) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 3719—3725.
106. Holy A. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 223—231.
107. Holy A. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 2245—2256.
108. Griffin B. E., Reese C. B., Stephenson G. F., Trentham D. R. (1966) *Tetrahedron Lett.*, 4349—4352.
109. Cohn W. E., Doherty D. G. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 2863—2866.
110. Ness R. K., Fletcher H. G. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 4710—4714.
111. Kupchan S. M., Slade P., Young R. J., Milne G. W. A. (1962) *Tetrahedron*, **18**, 499—508.

112. Reese C. B., Trentham D. R. (1965) *Tetrahedron Lett.*, 2459—2462.
113. Fromageot H. P. M., Griffin B. E., Reese C. B., Sulston J. E., Trentham D. R. (1966) *Tetrahedron*, **22**, 705—710.
114. Reese C. B., Trentham D. R. (1965) *Tetrahedron Lett.*, 2467—2472.
115. Fromageot H. P. M., Reese C. B., Sulston J. E. (1968) *Tetrahedron*, **24**, 3533—3540.
116. Jarman M., Reese C. B. (1964) *Chem. and Ind.*, 1493.
117. Griffin B. E., Reese C. B. (1964) *Tetrahedron Lett.*, 2925—2931.
118. Reese C. B., Saffhill R., Sulston J. E. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 3366—3368.
119. Green D. P. L., Ravindranathan T., Reese C. B., Saffhill R. (1970) *Tetrahedron*, **26**, 1031—1041.
120. Reese C. B., Stewart J. C. M., Boom van J. H., Leeuw de H. P. M., Nagel J., Rooy de J. F. M. (1975) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 934—942.
121. Boom van J. H., Owen G. R., Preston J., Ravindranathan T., Reese C. B. (1971) *J. Chem. Soc. (C)*, 3230—3237.
122. Smrt J., Holy A. (1967) *Tetrahedron Lett.*, 981—983.
123. Smrt J., Malkiewicz A. (1973) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **38**, 2962—2975.
124. Griffin B. E., Reese C. B. (1968) *Tetrahedron*, **24**, 2537—2549.
125. Griffin B. E., Reese C. B. (1969) *Tetrahedron*, **25**, 4057—4069.
126. Michelson A. M., Todd A. R. (1955) *J. Chem. Soc.*, 2632—2638.
127. Letsinger R. L., Mahadevan V. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 3526—3527.
128. Letsinger R. L., Mahadevan V. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 5319—5324.
129. Letsinger R. L., Ogilvie K. K. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 4801—4803.
130. Letsinger R. L., Ogilvie K. K. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 3350—3355.
131. Letsinger R. L., Ogilvie K. K., Miller P. S. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 3360—3365.
132. Eckstein F., Rizk I. (1967) *Angew. Chem.*, **79**, 684.
133. Eckstein F., Rizk I. (1969) *Chem. Ber.*, **102**, 2362—2377.
134. Neilson T. (1969) *Chem. Commun.*, 1139—1140.
135. Grams G. W., Letsinger R. L. (1970) *J. Org. Chem.*, **35**, 868—870.
136. Neilson T., Werstiuk E. S. (1971) *Can. J. Chem.*, **49**, 493—499.
137. Neilson T., Werstiuk E. S. (1971) *Can. J. Chem.*, **49**, 3004—3011.
138. Neilson T., Wastrodowski E. V., Werstiuk E. S. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 1068—1074.
139. Werstiuk E. S., Neilson T. (1972) *Can. J. Chem.*, **50**, 1283—1291.
140. Werstiuk E. S., Neilson T. (1972) *Can. J. Chem.*, **51**, 1889—1892.
141. Neilson T., Werstiuk E. S. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 2295—2297.
142. Boom van J. H., Rooy de F. M., Reese C. B. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 2513—2517.
143. Cusack N. J., Reese C. B., Boom van J. H. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 2209—2212.
144. Boom van J. H., Burgers P. M. J., Deursen van P. H., Arentzen R., Reese C. B. (1974) *Tetrahedron Lett.*, 3785—3788.
145. Itakura K., Bahl C. P., Katagiri N., Michniewicz J. J., Wightingman R. H., Narang S. A. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 3649—3651.
146. Smrt J. (1972) *Tetrahedron Lett.*, 3437—3440.
147. Smrt J. (1973) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **38**, 3189—3197.
148. Smrt J. (1972) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 1870—1882.
149. Smrt J. (1972) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 846—861.
150. Letsinger R. L., Miller P. S. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 3356—3359.
151. Smrt J. (1975) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **40**, 1043—1052.
152. Eckstein F., Scheit K. H. (1967) *Angew. Chem.*, **79**, 317—318.
153. Franke A., Scheit K. H., Eckstein F. (1968) *Chem. Ber.*, **101**, 2998—3001.
154. Smrt J. (1973) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **38**, 3642—3647.
155. Catlin J. C., Cramer F. (1973) *J. Org. Chem.*, **38**, 245—250.
156. Smrt J. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 4727—4730.
157. Zielinski W. S., Smrt J. (1974) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **39**, 2483—2490.
158. Николаев А. В., Туркин С. И., Потанов В. К., Шабарова З. А. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1236—1237.
159. Takaku H., Shimada J. (1973) *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 445—447.
160. Kampe W. (1966) *Chem. Ber.*, **99**, 593—601.
161. Cramer F. (1970) *Colloques, Internationaux du C.N.R.S.*, vol. 182, pp. 343—352, Paris.
162. Yip K. F., Tsou K. S. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 3272—3276.
163. Ohtsuka A., Morioka S., Ikehara M. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 3229—3233.
164. Agarwal K. L., Yamazaki A., Khorana H. G. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 2754—2762.
165. Ohtsuka E., Morioka S., Ikehara M. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 8437—8440.
166. Hata T., Tajima K., Mukaiyama T. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 4928—4930.
167. Tajima K., Hata T. (1972) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **45**, 2608—2610.
168. Hata T., Nakagawa I., Takebayashi N. (1972) *Tetrahedron Lett.*, 2931—2934.
169. Hata T., Nakagawa I., Nakada Y. (1975) *Tetrahedron Lett.*, 467—470.

Поступила в редакцию 12.III.1976



# CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES

MIKHAILOV S. N., FLORENTIEV V. L.

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

The review encompasses the current state of the chemical methods of oligoribonucleotides synthesis. In the first section, activating agents and protecting groups used in the synthesis of oligonucleotides are discussed. The next two sections deal with the methods for protection of functional groups in nucleosides and nucleotides, as well as with various aspects of internucleotide bonds formation by diester and triester methods. The last part is devoted to scope and limitations of oligoribonucleotide synthesis.

---