



УДК 547.963.32.057

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2'-О-БЕНЗОИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ

*Рознерс Э.З., Кумлиныч В.Х., Рекис А.Х.,
Виздена Э.О.*

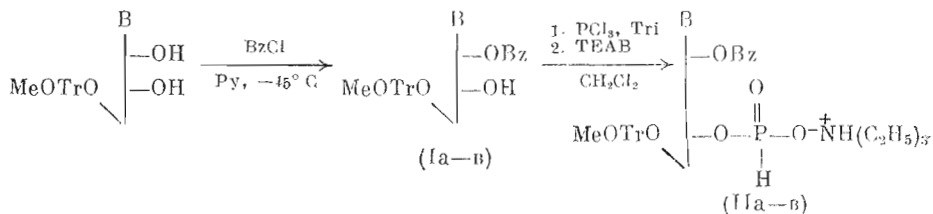
Рижский политехнический институт им. А. Я. Пельше

Н-Фосфонатный метод синтеза дезоксиолигонуклеотидов [1] успешно применяется и для получения олигорибонуклеотидов с использованием для защиты 2'-ОН-функции триалкилсилильной или тетрагидропиранильной группы [2-4].

Нами для этих целей впервые использована бензоильная защитная группа, введенная путем селективного бензоилирования N-ацил-5'-О-монометокситритильнуклеозидов, полученных по стандартным методикам. Бензоилирование проведено в растворе абсолютного пиридина при -45°C по методу Кемпе [5]. Метод привлекателен несложным синтезом селективно защищенных рибонуклеозидов и устойчивостью 2'-О-бензоильной защиты в условиях отщепления тритильных групп.

Полученные N,2',5'-защищенные нуклеозиды (Ia-v) выделены из реакционной смеси осаждением петролейным эфиром и использованы без хроматографической очистки для получения их 3'-фосфонатов. Выходы производных (Ia-v) составляют 69, 75 и 80% соответственно. Синтез нуклеозид-Н-фосфонатов (IIa-v) вели по аналогии с методом [1] для дезоксинуклеотидных мономеров. Выходы фосфонатов (IIa-v) после хроматографической очистки в колонках с силикагелем (0-10% градиент MeOH в CHCl_3 , содержащем 1% NEt_3) составляют 81, 85 и 65% соответственно. Фосфонаты (IIa-v) индивидуальны по данным ТСХ (силуфол UV-254, система $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 9:1) и спектроскопии ^{31}P -ЯМР. Они не теряют реакционной способности в течение 3-4 мес при -10°C в атмосфере аргона.

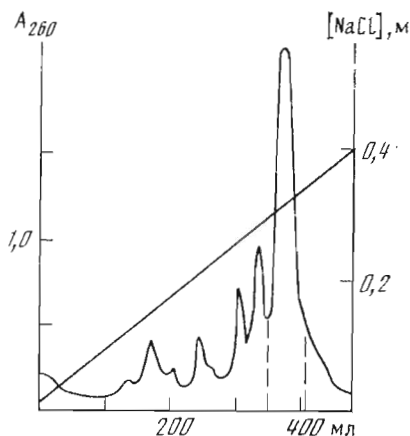
^{31}P -ЯМР-спектр (при 36,43 МГц в CDCl_3): 3,2 м. д., $^1J_{\text{H,P}}$ 627 Гц, $^2J_{\text{H,P}}$ 10,0 Гц (IIa); 3,1 м. д., $^1J_{\text{H,P}}$ 627 Гц, $^3J_{\text{H,P}}$ 10,1 Гц (IIб); 2,6 м. д., $^1J_{\text{H,P}}$ 634 Гц, $^3J_{\text{H,P}}$ 11,5 Гц (IIв) (относительно 85% H_3PO_4).



B -- Ura (a), bzAde (б), ibGua (в)
Tri -- 1, 2, 4-триазол, ib -- изобутирилг.

Для синтеза олигонуклеотидов использовали носитель на основе силиохлама С-80 (200 мг), содержащий примерно 5 мкмоль иммобилизованного нуклеозидов. Синтез осуществляли в шприце емкостью 2 мл путем периодического забора и выдавливания реагентов и растворителей согласно карте операций (таблица).

Из фосфонатов (IIa-v) в присутствии пивалоилхлорида нами синтезированы олигорибонуклеотиды ApUpGpApGpG и $\text{ApUpGp}(\text{Up})_3\text{U}$. Сред-



Выделение из реакционной смеси олигорибонуклеотида $ApUpGp(Up)_3U$ хроматографией на DEAE-сефадексе (10×400 мм), элюция (20 мл/ч) линейным градиентом концентрации NaCl в 0,01 М буфере трис-HCl (pH 7,6), содержащем 7 М мочевицу

Карта операций наращивания олигонуклеотидной цепи

Операция	Реагент, растворитель	Время, мин
Промывка	CH_2Cl_2 (3×1 мл)	0,5
Деблокирование	1% CF_3COOH в CH_2Cl_2 (5×1 мл)	3
Промывка	CH_3CN (4×1 мл)	
Конденсация	$CH_3CN - Pu$ (1 : 1) (4×1 мл) 0,5 мл 0,1 М (Ia-v) + 0,5 мл 0,5 М пивалонил-хлорида в $CH_3CN - Pu$ (1 : 1)	1,5
Промывка	CH_3CN (5×1 мл)	5
		1
Повторение цикла наращивания олигонуклеотидной цепи до набора необходимой последовательности		
Промывка	Pu (5×1 мл)	1
Окисление	2% I_2 в $Pu - H_2O$ (98 : 2), 4 мл	10
Промывка	CH_3CN (6×1 мл), CH_2Cl_2 (3×1 мл)	2
Деблокирование	1% CF_3COOH в CH_2Cl_2 (5×1 мл)	3
Промывка	CH_3CN (5×1 мл)	1

ний выход олигонуклеотидов на стадиях наращивания олигонуклеотидной цепи составлял 94 и 95% соответственно. Олигонуклеотиды снимали с носителя обработкой концентрированным водным аммиаком в течение 1 ч при 18–20° С. Отщепление защитных групп проводили смесью *n*-бутиламин – метанол – диоксан (1 : 1 : 2) в течение 7 ч при 40° С. Разделение реакционной смеси проводили ионообменной хроматографией (рисунок). Выделенную фракцию рехроматографировали в той же системе. Общий выход очищенных олигонуклеотидов составляет 8–10%. Нуклеотидный состав и отсутствие неприродных межнуклеотидных связей подтвердили путем гидролиза кислой неспецифической РНКазой (КФ 3.1.27.1) с последующим анализом гидролизата БХ и ВЭЖХ.

Таким образом, в настоящей работе показана возможность использования 2'-О-бензоилнуклеозидов для синтеза олигорибонуклеотидов Н-фосфонатным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399–5407.
2. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R., Henrichson C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4055–4058.
3. Strömberg R. // Chem. Commun. Univ. Stockholm. 1987. № 1. P. 42–48.
4. Веньяминова А. Г., Левина А. С., Косолапова З. А., Репкова М. Н. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1588–1590.

Поступило в редакцию
3.II.1988

После доработки
11.V.1988

**SOLID PHASE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES
BY THE H-PHOSPHONATE METHOD USING 2'-O-BENZOYL PROTECTIVE
GROUP**

ROZNERIS E., KUMPIŅŠ V., REKIS A., BIZDENA E.

A. Pelše Polytechnical Institute, Riga

Synthesis of oligoribonucleotides by the H-phosphonate approach using 2'-O-benzoyl protecting group with the yields 94-95% per stage is described.