



УДК 547.963.32.057

**СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ТРИУРИДИЛАТОВ
Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ**

Шевченко Н. М., Шаламай А. С., Усенко Л. С.

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

При изучении механизмов трансляции в бесклеточных белоксинтезирующих системах в качестве кодонов находят применение различные синтетические тринуклеозиддифосфаты [1]. В системе кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК рибосомами применение триуридилатов, содержащих 2'-дезоксинуридин, позволит оценить стабильность и структурно-функциональные особенности тройного комплекса трансляции.

Олигорибонуклеотидный синтез достиг значительного успеха в связи с автоматизацией твердофазного фосфитамидного метода [2], а в последнее время получил дальнейшее развитие благодаря разработке Н-фосфонатного варианта конденсации [3, 4].

Гомогенный синтез модифицированных триуридилатов в требуемых микроколичествах (10—30 ОЕ₂₆₀) довольно трудоемок и длителен в силу известных сложностей постадийных операций выделения и очистки. Несмотря на малый размер тринуклеотидов, твердофазный вариант их получения Н-фосфонатным методом был целесообразен, поскольку позволял найти оптимальные условия межнуклеотидной конденсации и разработать карту-схему синтеза олигорибонуклеотидов (табл. 1).

Для получения модифицированных триуридилатов были синтезированы триэтиламмониевые соли 3'-Н-фосфонатов 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропирианилуридина (Ia) и 5'-О-диметокситритил-2'-дезоксинуридина (Iб) в условиях, близких к синтезу дезоксирибонуклеотидных мономеров [5]. Особенности проведения реакции заключались в применении N-этилморфолина в качестве основания и в трехкратном увеличении концентрации реагентов. Выходы 3'-Н-фосфонатов (Ia) и (Iб) после колоночной хроматографии (0—15% MeOH в CHCl₃) и/или осаждения смесью эфир — гексан (1 : 1) составляли соответственно 90 и 93%.

Исходный 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропирианилуридин был получен с применением 3',5'-тетраизопропилдисилоксановой защиты согласно работам [6, 7]. В качестве твердофазного носителя использовали силохром С-250, модификацию поверхности которого и иммобилизацию 5'-О-диметокситритилнуклеозидов выполняли по известной методике [8]. Емкость полимера по присоединенному нуклеозиду составляла 65—70 мкмоль/г.

Таблица 1

Цикл межнуклеотидной конденсации

Операция	Реагенты и растворители	Время, мин
Деблокирование	0,1 М TsOH в CH ₂ Cl ₂ -C ₂ H ₅ OH (4 : 1) (0,5 мл)	2,5
Промывка	CH ₃ CN (5 мл)	3
Конденсация	На 3,5 мкмоль иммобилизованного нуклеозида 10 мкмоль 3'-Н-фосфоната и 40 мкмоль пивалоилхлорида в 0,5 мл пиридина	1
Промывка	CH ₃ CN (5 мл)	3
Конец цикла *		

* Окисление тринуклеотида проводили 0,5 мл 0,25 М I₂ в смеси тетрагидрофуран — пиридин — H₂O (9 : 0,5 : 0,5) в течение 5 мин.

Выходы модифицированных триуридилатов *

Тринуклеотид 5'—3'	Выход по $(\text{MeO})_2\text{Tg}^+$, %		Выход после очистки	
	межнуклеотидная конденсация		%	ОЕ ₂₆₀
	I	II		
UpUpU	80	94	58	53
dUpUpU	75	99	54	46
UpdUpU	89	95	64	61
UpUpdU	80	93	57	52
dUpdUpU	88	96	63	60
dUpdUpdU	95	97	75	76

* Синтезы на 50 мг полимерного носителя (~3,5 мкмоль 3'-концевого звена).

Синтез тринуклеотидов проводили в проточном реакторе в атмосфере сухого аргона в соответствии с разработанной картой-схемой (табл. 1). Выходы на каждом этапе наращивания цепи определяли спектрофотометрически по отщепленному $(\text{MeO})_2\text{Tg}^+$ -катиону. При изучении межнуклеотидной конденсации с различными количествами 3'-Н-фосфонатов (Ia) и (Iб) было найдено, что их 20—40-кратные избытки по отношению к ОН-компоненту [3—5] не нужны, так как более чем трехкратные избытки не приводили к повышению выхода.

Наблюдавшиеся умеренные выходы динуклеотидов (табл. 2) объясняются, по-видимому, стерическим экранированием гидроксильной группы ОН-компонента со стороны полимера и наличием объемистого 2'-О-тетрагидропиранильного заместителя в составе 3'-Н-фосфоната (Ia). Последний вывод подтверждается конденсациями с участием 3'-Н-фосфоната (Iб), где выходы были в пределах 88—89%.

Отсутствие защитных групп по гетероциклу и фосфату позволило быстро отщеплять олигомеры от полимерного носителя (конц. водный аммиак, 50° С, 10 мин). 2'-О-Защитные группы удаляли стандартным методом. Модифицированные триуридилаты выделяли ионообменной хроматографией (DEAE-Toyorearl, 0—0,2 М NaCl в трис-НСl, рН 7,3) с последующим обессоливанием на обращенно-фазовой колонке (силасорб С₁₈, 0—5% CH₃CN в воде).

Гомогенность синтезированных триуридилатов была подтверждена данными микроколоночной ВЭЖХ исходных веществ (силасорб С₁₈, 0,5—7% CH₃CN в 0,1 М ацетате аммония) и продуктов их ферментативного гидролиза (силасорб-NH₂, 0,2 М КН₂РO₄ в 10% CH₃CN). Показано, что состав продуктов гидролиза триуридилатов Т₂-РНКазой из *Aspergillus oryzae* (КФ 3.1.27.1) четко зависит от расположения остатка 2'-дезоксиринидина в нуклеотидной цепи.

Таким образом, были найдены оптимальные условия проведения межнуклеотидной конденсации и показано, что твердофазный вариант Н-фосфонатного метода может быть успешно применен для синтеза коротких олигорибонуклеотидов.

Авторы благодарят Г. В. Панасенко за любезно предоставленный твердофазный носитель и помощь при хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веньямина А. Г., Овчаренко Г. В., Репкова М. И., Франк Л. А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1376—1379.
2. Веньямина А. Г., Косолапова В. А., Левина А. С. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 125—127.
3. Garegg P. J., Lingh I., Regberg T., Stavinski J., Strömberg R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 26. № 34. P. 4055—4058.
4. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 7235—7248.

5. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5393—5396.
6. Markiewicz W. T., Biala E., Kierzek R. // Bull. Acad. pol. sci. 1984. V. 32. № 11—12. P. 433—438.
7. Takaki H., Yoshida M., Nomoto T. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. № 9. P. 1399—1403.
8. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 920—926.

Поступило в редакцию

4.VIII.1987

После доработки

25.I.1988

SYNTHESIS OF MODIFIED TRIURIDILATES BY THE H-PHOSPHONATE METHOD

SHEVCHENKO N. M., SHALAMAY A. S., USENKO L. S.

*Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Triuridilates containing a 2'-deoxyuridine residue were synthesized by the solid-phase H-phosphonate method with 57—64% yields. The process of the nucleotide condensation was shown to be affected by steric surrounding of 2'-substituent of P-component.