



УДК 547.963.32.057:546.183

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  $\beta$ -ЦИАНЭТИЛФОСФИТАВеньямина А. Г., Левина А. С., Репкова М. Н.,  
Ченцова Н. А.Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР

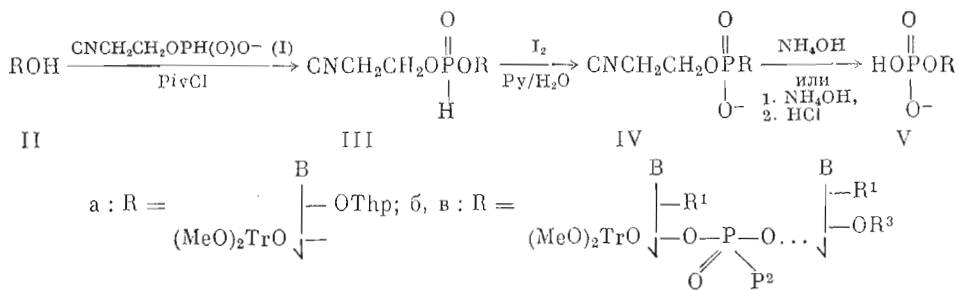
Проблеме химического фосфорилирования синтетических олигонуклеотидов в последние годы посвящено значительное число работ (см., например, [1–5]), предлагающих ряд методов, основанных на применении производных как пяти-, так и трехвалентного фосфора. Большинство этих методов требует использования лабильных или труднодоступных реагентов или же значительного усложнения процедуры удаления защитных групп. Наиболее удобными из предложенных ранее фосфорилирующих агентов являются, как нам кажется, бис( $\beta$ -цианэтил)- $N$ ,  $N$ -диизопропил- и метил-,  $\beta$ -цианэтил- $N$ ,  $N$ -диизопропиламинофосфиты, используемые для твердофазного 5'-фосфорилирования дезоксирибоолигонуклеотидов в рамках стандартной фосфитаминой схемы [4, 5].

В данной работе предлагается еще один простой и легко осуществимый в автоматическом варианте способ фосфорилирования олигонуклеотидов, основанный на реакции моноалкилфосфитов со спиртами в присутствии  $PivCl$ , широко используемой в настоящее время для  $H$ -фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов [6–8]. В качестве моноалкилфосфита был выбран  $\beta$ -цианэтилфосфит, поскольку моноцианэтильную защитную группу можно удалять с концевой фосфата в стандартных условиях деблокирования олигонуклеотидов [4].

$\beta$ -Цианэтилдихлорфосфит ( $^{31}P$ -ЯМР:  $\delta=175$  м.д.,  $Pu-CH_2CN$  (1:1) [9]) прибавляли по каплям в ледяную воду, смесь концентрировали упариванием, нейтрализовали триэтиламин, сушили упариванием с абс. ацетонитрилом и остаток обрабатывали абс. ацетонитрилом. После отделения осадка  $Et_3N \cdot HCl$  фильтрат, содержащий триэтиламонийцианэтилфосфит (I), использовали для дальнейшей работы. При хранении раствора в течение нескольких месяцев при комнатной температуре изменений в  $^{31}P$ -ЯМР-спектре не наблюдали. Структура фосфита (I) была подтверждена данными  $^1H$ - и  $^{31}P$ -ЯМР-спектроскопии ( $^1H$ -ЯМР,  $(CH_3)_2CO-d_6$ , м.д.: 11,8; 1,6 (д, 1H,  $J_{H,P}$  610 Гц); 10,8 (м, 1H); 3,9 (к, 2H,  $J$  7 Гц); 3,0 (м, 8H); 1,3 (т, 9H,  $J$  7 Гц);  $^{31}P$ -ЯМР,  $Pu-CH_2CN$  (1:1), м.д.: 1,6 ( $J_{H,P}$  610 Гц)), а также описанными ниже химическими превращениями.

При взаимодействии  $\beta$ -цианэтилфосфита (I) с избытком  $PivCl$  в смеси  $Pu-CH_2CN$  (1:1) в отсутствие  $OH$ -компонента в спектре  $^{31}P$ -ЯМР появлялся сигнал при 120 м.д., который, по аналогии с данными работы [10], можно отнести к бисацилпроизводному цианэтилфосфита  $CNC_2H_4OP \cdot (OSOC(CH_3)_3)_2$ . В присутствии же одного эквивалента  $OH$ -компонента, например 5'- $O$ -диметокситритил-2'- $O$ -тетрагидропиранил- $N^4$ -бензоилцитидина (IIa), через 1–2 мин после добавления избытка  $PivCl$  полностью исчезал сигнал исходного фосфита (I) (1,6 м.д.) и появлялся сигнал нуклеозидцианэтилфосфита (IIIa) с центром при 7,2 м.д.,  $J_{H,P}$  710 м.д. [11]. Соединение (IIIa) ( $R$ , 0,52, ТСХ,  $EtOH-CHCl_3$ , 1:10, положительная реакция с нингидрином [12]) после обработки реакционной смеси 0,2 М  $I_2$

Сокращения  $Pu$  – пиридин, TEA – триэтиламин,  $Piv$  – пивалоил, Thr – тетрагидропиранил-2.



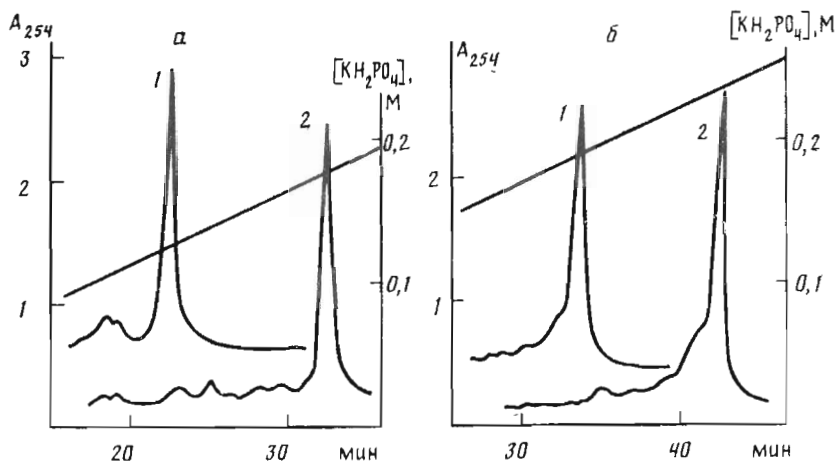
Соединение	а		б			в		
	В		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
II	bzC	OThp	H	H	~P	H	OCH <sub>3</sub>	~P
III	bzC	OThp	H	H	~P	H	OCH <sub>3</sub>	~P
IV	bzC	OThp	OH	OH	~P	H	OCH <sub>3</sub>	~P
V	C	OH	OH	OH	H	H	OH	H

В — N-защитное гетероциклическое основание.  
 ~P — модифицированный [8] полимерный носитель СРГ-500.

в Р<sub>у</sub>-Н<sub>2</sub>О (98:2) в течение 15 мин количественно превращался в соответствующий нуклеозидцианэтилфосфат (IVa) с δ = -1 м.д. и нулевой подвижностью при ТСХ. Его аммонолиз (60° С, 16 ч) приводил к β-элиминированию цианэтильной группы и соответственно к нуклеозидфосфату (Va) с δ = +0,3 м.д.

Полученные данные говорят о том, что β-цианэтилфосфит (I) — стабильный и эффективный фосфорилирующий агент, который может быть использован для фосфорилирования олигонуклеотидов.

Олигорибонуклеотид УСССАУ был получен Н-фосфонатным методом на синтезаторе «Виктория-4М» [8] с использованием носителя СРГ-500. К высушенной навеске (7 мг) полимера, содержащего защищенный олигорибонуклеотид со свободным 5'-ОН (IIб), добавили 100 мкл 0,05 М раствора цианэтилфосфита (I) в смеси Р<sub>у</sub>-СН<sub>3</sub>СН (1:1) и 5 мкл РивСл, выдержали 15 мин при комнатной температуре, промыли полимер пиридином, выдержали 30 мин с 0,2 М I<sub>2</sub> в Р<sub>у</sub>-Н<sub>2</sub>О (98:2), промыли ацетоном и обработали конц. NH<sub>4</sub>ОН (16 ч при 60° С) и затем 0,01 М НСл (2 ч при 50° С) для удаления защитных групп. С другой порцией полимера, содержащего защищенный олигорибонуклеотид, провели те же самые операции, за ис-



Ионообменная ВЭЖХ реакционных смесей до (1) и после (2) фосфорилирования олигонуклеотидов УСССАУ (а) и d(TTCCCATTCGAAG) (б) после деблокирования: колонка 4,6×250 мм с Полисиллом-СА отечественного производства, градиент концентрации КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub> (О→0,3 М) в 30% СН<sub>3</sub>СН, скорость элюции 3 мл/мин

ключением обработки цианэтилфосфитом. Ионобменные ВЭЖХ реакционных смесей 1 и 2 (рисупок, а) свидетельствуют о практически количественном фосфорилировании УСССАУ. Наличие 5'-фосфата было подтверждено также гидролизом гексануклеотида (Vб) щелочной фосфомоноэстеразой и последующей ВЭЖХ.

Аналогичные результаты были получены при твердофазном фосфорилировании dC<sub>6</sub> (данные не приведены) и d(TTCCCATTCGAAG) (IV) (см. рисупок), полученных автоматическим фосфитамидным методом [13].

Таким образом, на примере 3'-фосфорилирования защищенного мономера и 5'-фосфорилирования ряда олигонуклеотидов показано, что предложенный метод достаточно универсален: его можно использовать для фосфорилирования как моно-, так и олигонуклеотидов рибо- и дезоксириборяда, полученных Н-фосфонатным и фосфитамидным (вероятно, и фосфотрифирным) методами на полимере или в растворе.

Авторы благодарят В. Ф. Зарытову и В. В. Горна за участие в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marugg J. E., Piel N., McLaughlin L. W., Tromp M., Veeneman G. H., van der Marrel G. A., van Boom J. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8639–8651.
2. Pressova M., Smrt J. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1987. № 18. P. 101–104.
3. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потанов В. К., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034–1039.
4. Horn T., Urdea M. S. // DNA. 1986. V. 5. № 5. P. 424–426.
5. Uhlmann E., Engels J. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 9. P. 1023–1026.
6. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399–5407.
7. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051–4058.
8. Веньяминова А. Г., Косолапова З. А., Левина А. С., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1588–1590.
9. Ogilvie K. K., Theriault N. Y., Seifert J.-M., Pon R. T., Nemer M. J. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 18. P. 2686–2693.
10. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655–662.
11. Бацук О. С., Зарытова В. Ф., Левина А. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 606–614.
12. Предводителев Д. А., Иванова В. И., Аларкон Х. Х., Ницаптьев Э. Е. // Журн. общ. химии. 1978. Т. 48. № 6. С. 1273–1276.
13. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Потанов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119–123.

Поступило в редакцию  
28.XI.1988

#### PHOSPHORYLATION OF OLIGONUCLEOTIDES BY MEANS OF β-CYANOETHYLPHOSPHITE

VENIJAMINOVA A. G., LEVINA A. S., REPKOVA M. N., CHENTSOVA N. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A simple and effective method of phosphorylation of the appropriately protected mono- and oligonucleotides by means of β-cyanoethylphosphite and pivaloyl chloride is described. Its versatility is exemplified by 3'-phosphorylation of 5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydropyranyl-N-benzoylcytidine and by 5'-phosphorylation of the immobilized protected rUCCCAU obtained by automatic H-phosphonate synthesis, and dC<sub>6</sub> and dTTCCCATTCGAAG obtained by automatic phosphoramidite method.