



УДК 547.963.32.057

© 1990 г.

*Э. З. Рознерс, А. Х. Рекис, В. Х. Кулпиньш,  
Э. О. Виздепа*

## СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЩЕЛОЧНОЛАБИЛЬНЫХ 2'-О-ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

### II\*. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 2'-О-БЕНЗОИЛЬНОЙ И АНИЗОИЛЬНОЙ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

*Рижский политехнический институт*

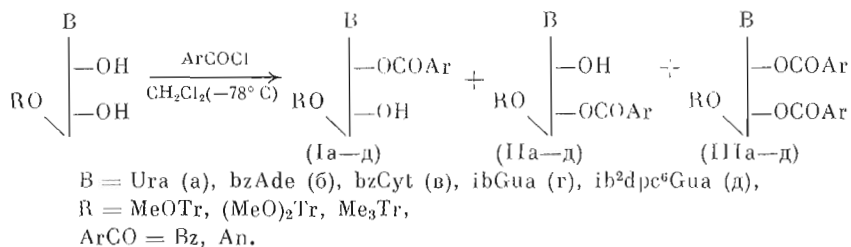
С целью оптимизации синтеза олигорибонуклеотидов Н-фосфонатным методом с использованием 2'-О-ароильных защитных групп проведен синтез ряда олигорибонуклеотидов длиной 6—10 нуклеотидных звеньев твердофазным методом в шприце. Для защиты 5'-ОН-функции применены монометокси-, диметокси- и триметилтригидропиранильные, для 2'-ОН-группы — бензоильная и анизоильная группы. Методом ВЭЖХ исследована скорость изомеризации 2'-О-ароилнуклеозидов в их 3'-изомеры. Исследовано несколько вариантов окисления олигонуклеотид-Н-фосфонатов.

Актуальным вопросом олигорибонуклеотидного синтеза является выбор 2'-О-защитной группы. Исследователи, предпочитавшие Н-фосфонатный метод синтеза, использовали триалкилсилильную [2, 3], тетрагидропиранильную [4, 5], а также *o*-нитробензильную [6] защиту. Примененная нами [1] бензоильная защитная группа позволяет значительно упростить синтез селективно защищенных рибонуклеозидов, однако она имеет серьезный недостаток — способность к миграции в 2',3'-*цис*-диолевой системе рибозы.

Проведенные нами исследования по определению влияния природы заместителя в бензоильном кольце на скорость изомеризации 2'-О-ароилнуклеозидов указали на тенденцию снижения скорости изомеризации при введении электронодонорных заместителей.

Наиболее перспективным мы считаем применение анизоильной 2'-О-защитной группы. Выбор обусловлен, с одной стороны, низкой скоростью миграции анизоильной группы, а с другой — доступностью анизоилхлорида, который является коммерческим препаратом.

Нами синтезирован ряд защищенных рибонуклеозидов с 2'-О-бензоильной и анизоильной защитными группами, а также с различными 5'-О-тригидропиранильными группами (MeOTr, (MeO)<sub>2</sub>Tr, Me<sub>3</sub>Tr). Для защиты лактамной системы гуанозина в некоторых случаях применена дифенилкарбамоильная [7] группа.<sup>1</sup>



\* Сообщение I см. [1]. Сокращения: Ar — арил, An — анизоил, ib — изобутирил, dpc — дифенилкарбамоил, PivCl — пивалоилхлорид, Melm — метилимидазол, THF — тетрагидрофуран, Me<sub>3</sub>Tr — триметилтрил.

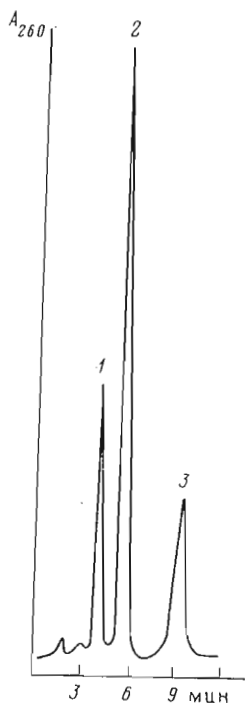
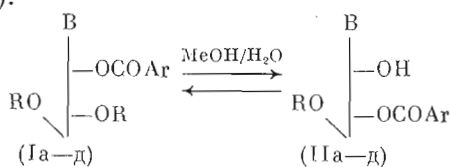


Рис. 1. Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ продуктов бензоилирования  $(Me_3Tr)bzA$  после выдерживания их 30 мин в элюенте. Колонка силасорб- $C_{18}$ , 5 мкм ( $64 \times 2$  мм), элюент —  $CH_3OH-H_2O$  (87 : 13), скорость потока 50 мкл/мин. Пики: 1 — (Iб), 2 — (IIб), 3 — (IIIб)

Проводя реакцию N,5'-O-защищенного нуклеозида с ароилхлоридом в растворе метилхлорида при  $-78^\circ C$ , удается получить эфир (Iа—д), содержащий в качестве примесей 5—10% диэфира (IIIа—д) и менее 1% эфира (IIа—д) (анализ ВЭЖХ).

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ исследовалась кинетика миграции бензоильной и анизоильной групп. Производные (Iа—д) выдерживали в водно-метанольной среде (87 : 13) при  $24^\circ C$ , периодически проводя хроматографический анализ (рис. 1). Из данных хроматографического анализа строили кривые изменения концентрации производных (Iа—д) (в процентах по отношению к сумме изомеров (Iа—д) и (IIа—д)) во времени (рис. 2).



В большинстве случаев 2'-O-анизоилнуклеозиды изомеризуются медленнее, чем соответствующие 2'-O-бензоилпроизводные. На скорость изомеризации сильно влияет также природа 5'-O-защитной группы. Очевидно, что подбором оптимальной комбинации защитных групп для каждого нуклеозида изомеризацию 2'-O-ароилнуклеозидов можно свести к минимуму, как в случае  $(MeOTr)U(An)$ ,  $(MeOTr)bzC(An)$ ,  $(Me_3Tr)bzC(Bz)$ ,  $[(MeO)_2Tr]bzA(An)$  и  $[(MeO)_2Tr]ibG(Bz)$ .

Рибонуклеозид-Н-фосфонаты (IVа—д) синтезировали по аналогии с методом Матеучи [8] для дезоксирибонуклеозидов. Носители для твердофазного синтеза на основе силихрома С-80 получили известным способом [9]. Синтез олигорибонуклеотидов на 200 мг носителя, содержащего  $\sim 10$  мкмоль иммобилизованного первого нуклеозида, осуществляли в шприце емкостью 2 мл. Активацию Н-фосфонатов проводили непосредственно в шприце путем поочередного отбора небольших количеств (0,2—0,3 мл) растворов соединений (IVа—д) и пивалоилхлорида, использовали 15—20-кратный избыток Н-фосфоната. Средний выход, рассчитанный по поглощению тритилкатиона, на одну стадию конденсации 95—97%. Синтез олигорибонуклеотидов проведен согласно карте операций (табл. 1), в которой введены некоторые изменения по сравнению с работой [1].

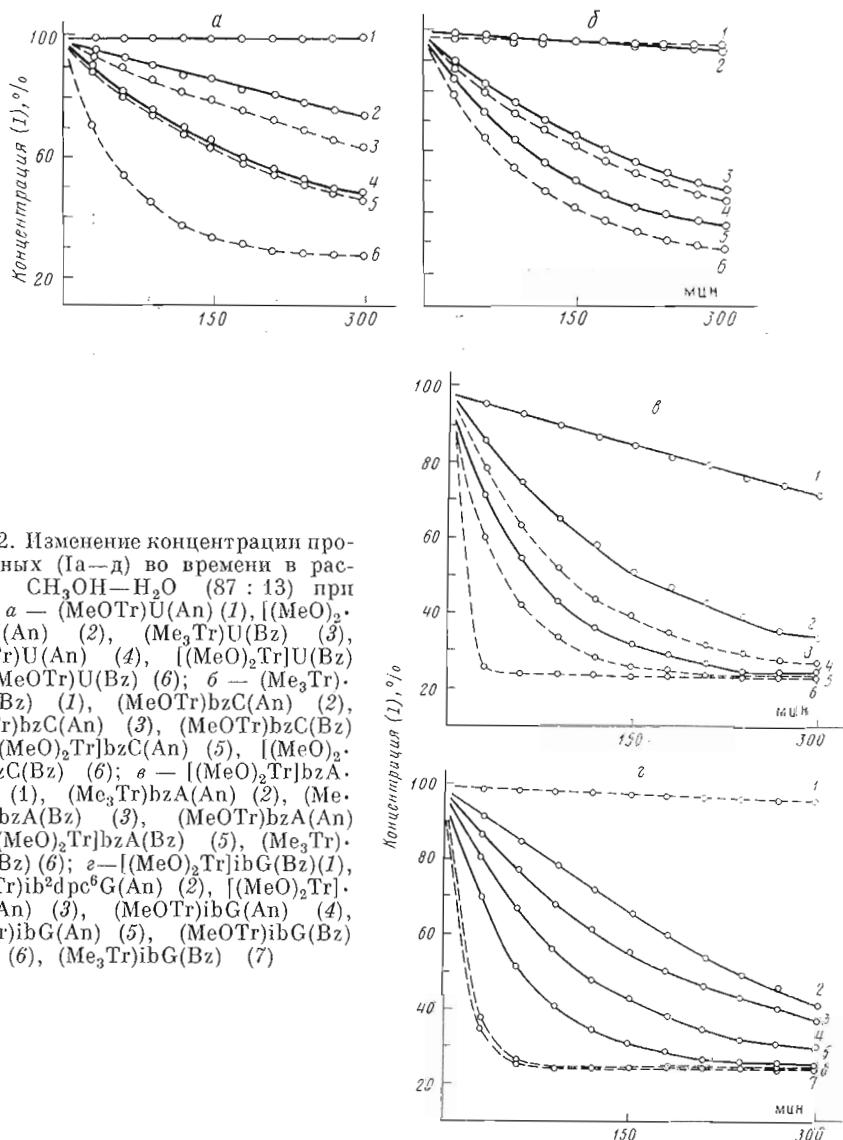


Рис. 2. Изменение концентрации производных (1а—д) во времени в растворе  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (87 : 13) при  $24^\circ\text{C}$ . а —  $(\text{MeOTr})\text{U}(\text{An})$  (1),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{U}(\text{An})$  (2),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{U}(\text{Bz})$  (3),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{U}(\text{An})$  (4),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{U}(\text{Bz})$  (5),  $(\text{MeOTr})\text{U}(\text{Bz})$  (6); б —  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzC}(\text{Bz})$  (1),  $(\text{MeOTr})\text{bzC}(\text{An})$  (2),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzC}(\text{An})$  (3),  $(\text{MeOTr})\text{bzC}(\text{Bz})$  (4),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bzC}(\text{An})$  (5),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bzC}(\text{Bz})$  (6); в —  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bzA}(\text{An})$  (1),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzA}(\text{An})$  (2),  $(\text{MeOTr})\text{bzA}(\text{Bz})$  (3),  $(\text{MeOTr})\text{bzA}(\text{An})$  (4),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bzA}(\text{Bz})$  (5),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzA}(\text{Bz})$  (6); г —  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{ibG}(\text{Bz})$  (1),  $(\text{MeOTr})\text{ib}^2\text{pc}^6\text{G}(\text{An})$  (2),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{ibG}(\text{An})$  (3),  $(\text{MeOTr})\text{ibG}(\text{An})$  (4),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{ibG}(\text{An})$  (5),  $(\text{MeOTr})\text{ibG}(\text{Bz})$  (6),  $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{ibG}(\text{Bz})$  (7)

После завершения синтеза олигорибонуклеотид-Н-фосфонаты окисляют. Мы проверяли несколько способов окисления. Наилучшим вариантом в нашем случае является двухступенчатое окисление согласно работе [8] (метод А):  $0,05\text{ M I}_2$  в  $\text{THF} - \text{Py} - \text{MeIm} - \text{H}_2\text{O}$ , 90 : 5 : 1 : 5 (2,5 мин), и  $0,05\text{ M I}_2$  в  $\text{THF} - \text{NEt}_3 - \text{H}_2\text{O}$ , 90 : 5 : 5 (2,5 мин). Хоро-

Таблица 1

Последовательность операций цикла олигонуклеотидного синтеза

Операция	Растворители и реагенты	Время
Промывка	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2×1 мл)	10 с
Детритилирование	3% $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ в $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5×1 мл)	2–3 мин
Промывка	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2×1 мл) $\text{CH}_3\text{CN}$ (2×1 мл) $\text{CH}_3\text{CN} - \text{Py}$ (1 : 1) (2×1 мл)	30 с
Конденсация	0,7 мл 0,05 М (1Va–д) в $\text{CH}_3\text{CN} - \text{Py}$ (1 : 1) 0,5 мл 0,25 М $\text{PivCl}$ в $\text{CH}_3\text{CN} - \text{Py}$ (1 : 1) (повторяют 2 раза)	2 мин
Промывка	$\text{CH}_3\text{CN}$ (4×1 мл)	20 с

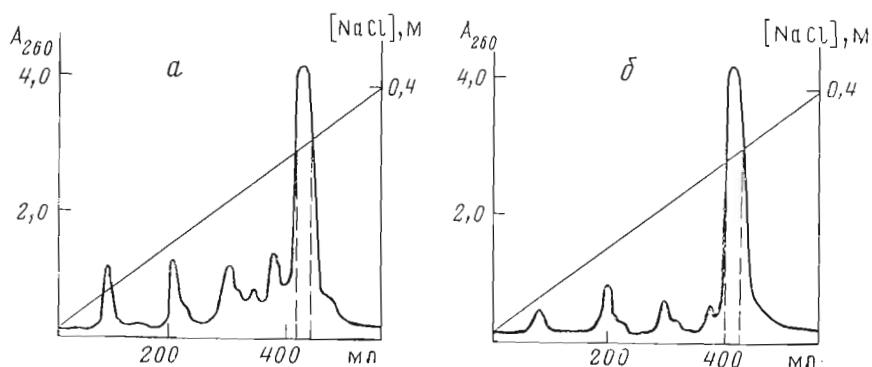


Рис. 3. Хроматография на DEAE-сефадексе А-25 (10 × 400 мл) реакционной смеси при синтезе олигорибонуклеотидов AUGAGG (синтезирован с использованием 2'-О-бензоильных защитных групп) (а) и AUGAAG (синтезирован с использованием 2'-О-анизойльных групп) (б). Линейный градиент концентрации NaCl в 0,01 М буфере трис-НСI (рН 7,5), содержащий 7 М мочевины. Скорость элюции при 20 мл/ч

шие результаты дает также использование реакции Тодда — Атертона [4] (метод В): Р<sub>у</sub> — Н<sub>2</sub>О — ССl<sub>4</sub> — NEt<sub>3</sub>, 30 : 8 : 8 : 1 (5 мин). Обработка 2% I<sub>2</sub> в Р<sub>у</sub> — Н<sub>2</sub>О, 98 : 2 (5 мин), [2, 10] (метод В), приводит к значительной деградации. Окисление 2% I<sub>2</sub> в Р<sub>у</sub> — АсОН, 9 : 1 (5 мин) [11], и персилилирование смесью Р<sub>у</sub> — NEt<sub>3</sub> — Me<sub>3</sub>SiCl, 94 : 3 : 3 (5 мин), с последующим окислением 0,2 М α,α-дипиридилдисульфидом в пиридине (5 мин) [3] приводит к полной деградации олигонуклеотида после обработки аммиаком и *n*-бутиламином.

После снятия с носителя и деблокирования олигорибонуклеотиды выделяли хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (рис. 3). Таким образом, с применением различных защитных групп и методов окисления синтезирован ряд олигорибонуклеотидов (табл. 2). Их выходы после хроматографии составляют 3—9%. В ходе олигонуклеотидного синтеза нами не обнаружено преимуществ той или иной защитной группы. Однако мы предпочитаем применение анизойльной группы для защиты 2'-ОН-функции, поскольку с анизойлхлоридом удобнее работать и степень деградации олигонуклеотида в тех же условиях в некоторой степени ниже.

Таблица 2

Условия синтеза олигорибонуклеотидов

Олигонуклеотид	5'-О-Защитная группа	2'-О-Защитная группа	Метод окисления **	Средний выход на стадии, %	Выход после хроматографии, %
AUGAGG	MeOTr	Bz	A	97	8
»	»	»	B	94	7
AUGAGG *	MeOTr для G (MeO) <sub>2</sub> Tr для A	An	A	96	4
AUGAAG	MeOTr для G (MeO) <sub>2</sub> Tr для A	»	A	95	5
AUGAAG *	MeOTr для G (MeO) <sub>2</sub> Tr для A	»	A	96	5
AUGAUG *	MeOTr для C (MeO) <sub>2</sub> Tr для A	»	A	96	3
UUUUUU	MeOTr	»	A	97	7
GGGGGG *	»	»	A	94	4
AAAAAA	(MeO) <sub>2</sub> Tr	»	A	95	6
»	MeOTr	»	B	96	6
CCCCCC	»	»	A	96	8
AUGUUUU	»	Bz	B	95	8
AUGUUUUUU	»	»	B	95	9
AUGAGGAGG	Me <sub>3</sub> Tr	»	A	95	4
AUUACCCAUG	»	»	B	97	7

\* Применена дополнительная 6-О-дифенилкарбамоильная защита гуанозина.

\*\* А — [8], В — [4], В — [2, 10]; см. также текст.

О дальнейшей очистке, анализе и биологической активности некоторых олигонуклеотидов будет сообщено отдельно.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-тритил-N-ацилрибонуклеозиды, полученные по стандартным методикам, 1-метилимидазол (Merck, ФРГ), дихлоруксусную кислоту (Fluka, Швейцария), DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу, бензоилхлорид (Reanal, ВНР), полученные известными способами 1,2,4-триазол, пивалоилхлорид и дифенилкарбамоилхлорид. Ацетонитрил (ч.) перегоняли 2 раза над  $\text{CaH}_2$ , метиленхлорид (ч.) перегоняли последовательно над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и  $\text{CaH}_2$ , триэтиламин (ч.) и N-метилморфолин (ч.) перегоняли последовательно над *n*-толуолсульфохлоридом и  $\text{P}_2\text{O}_5$ , KOH,  $\text{CaH}_2$ . Анизоилхлорид (ч.) перегоняли в вакууме.

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе «Милихром» (СССР). ТСХ проводили на пластинках силуфол UV-254 (Lachema, ЧССР) в системах хлороформ — метанол, 9 : 1 (А), толуол — этилацетат, 1 : 1 (Б), хлороформ — этилацетат, 3 : 4 (В). Препаративную хроматографию проводили в колонках (150 × 40 мм) на силасорбе 600 (30 мкм; Lachema, ЧССР); элюент — градиент метанола (0—10%) в хлороформе, содержащем 1% триэтиламина.

Спектрофотометрические измерения выполняли на приборе СФ-26 (СССР) при контроле синтеза по поглощению метокситритилкатиона при 478 нм, диметокситритилкатиона при 510 нм и триметилтритилкатиона при 450 нм.

*2-N-Изобутирил-6-О-дифенилкарбамоилгуанозин.* 17,65 г (50 ммоль) 2-N-изобутирилгуанозина упаривали с пиридином (2 × 100 мл), растворяли в 80 мл пиридина и добавляли 24 мл (250 ммоль) уксусного ангидрида. Смесь перемешивали 3 ч при 40° С, выливали в 250 мл охлажденного до 0° С 1 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , экстрагировали хлороформом (2 × 100 мл), органический слой промывали водой, сушили  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Остаток упаривали с абс. толуолом и сушили в вакууме до пенообразного состояния. Продукт — 2-N-изобутирил-2',3',5'-три-О-ацетилгуанозин — упаривали с пиридином (2 × 100 мл), растворяли в 80 мл пиридина и прибавляли 12,5 мл (90 ммоль)  $\text{N}(\text{Et})_3$  и 20,6 г (90 ммоль) дифенилкарбамоилхлорида. Смесь выдерживали 1 ч при 18—20° С, выливали в 150 мл воды и экстрагировали (2 × 100 мл) хлороформом. Органический слой промывали насыщенным  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили  $\text{MgSO}_4$  и упаривали досуха. К остатку добавляли 80 мл смеси  $\text{Pu} - \text{EtOH}$  (1 : 2) и встряхивали до полного растворения. Охлаждали до 0° С, прибавляли 55 мл 2 М раствора NaOH, и встряхивали 15 мин при 0° С. Смесь нейтрализовали добавлением 6 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , упаривали до 1/3 объема, добавляли 100 мл воды и экстрагировали хлороформом (2 × 200 мл). Хлороформный раствор промывали насыщенным  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили и упаривали досуха. Остаток упаривали с абс. толуолом и очищали колонной хроматографией на силикагеле, элюируя линейным градиентом концентрации метанола в хлороформе (0—10%). Фракции, содержащие соединение с  $R_f$  0,4 (система А), упаривали, остаток суспендировали в гексане, отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 2-N-изобутирил-6-О-дифенилкарбамоилгуанозина 15 г (55%).

*Общая методика получения N-ацил-5'-О-тритил-2'-О-бензоил(анизоил)-рибонуклеозидов (Ia—d).* N-Ацил-5'-О-тритилрибонуклеозид (10 ммоль) упаривали с пиридином (3 × 100 мл), прибавляли 5 мл пиридина и 100 мл метиленхлорида. Раствор охлаждали до -78° С (ацетон — сухой лед) и в течение 15 мин прибавляли 11 ммоль бензоилхлорида (анизоилхлорида). Реакционную смесь оставляли, периодически перемешивая, на 1—1,5 ч (контроль ТСХ, система А). Затем прибавляли 100 мл воды и встряхивали. Органический слой отделяли, сушили  $\text{MgSO}_4$ . Производные (Ia—d) осаждали петролейным эфиром, осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 70—80%.  $R_f$  0,40—0,50 ((Ia—в, д), система Б), 0,35—0,40 ((Iг), система В).

Общая методика получения рибонуклеозид-Н-фосфонатов (IVa—d). 5,68 г (44 ммоль) 1,2,4-триазола суспендировали в 200 мл метиленхлорида. К суспензии прибавляли 28 мл (248 ммоль) N-метилморфолина. Охлаждали до 0° С и в атмосфере аргона при перемешивании прибавляли 2,2 мл (24,8 ммоль) трихлорида фосфора. Перемешивали 30 мин при ~20° С. Охлаждали до -5° С и в течение 15 мин прибавляли раствор 5 ммоль эфира (Ia—d) (тщательно высушенного в вакууме) в 100 мл метиленхлорида. Смесь перемешивали 15 мин при -5° С и выливали в 300 мл 1,0 М ТЕАВ (рН 8,5), встряхивали, органический слой отделяли, сушили MgSO<sub>4</sub>, упаривали и очищали колоночной хроматографией. Нужные фракции объединяли и упаривали, очищенный продукт упаривали с ацетонитрилом и сушили 3—4 ч в вакууме 0,4 мм рт. ст. Выход фосфонатов (IVa—d) 60—70%. R<sub>f</sub> 0,30—0,35 (система А). Данные <sup>31</sup>P-ЯМР приведены в работе [1].

Синтез олигорибонуклеотидов проводили согласно карте операций (табл. 1) на ~200 мг полимерного носителя. После завершения синтеза олигонуклеотид-Н-фосфонат окисляли по методу А, Б или В, снимали с носителя обработкой 2 мл конц. водного аммиака в течение 1 ч при ~20° С. Защитные группы отщепляли обработкой в течение 7 ч при 40° С 5 мл смеси *n*-бутиламин — метанол — диоксан (1 : 1 : 2), раствор упаривали. Олигонуклеотиды выделяли хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-25 (рис. 3), рехроматографировали на ДЕАЕ-целлюлозе в той же системе и обессоливали на ДЕАЕ-сефадексе А-25 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме, упаривали и высушивали в вакууме.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рознер Э. З., Кумпиньш В. Х., Рекис А. Х., Виздена Э. О. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 14. № 11. С. 1580—1582.
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. 3—54.
4. Веньяминова А. Г., Левина А. С., Косолапова З. А., Ренкова М. Н. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1588—1590.
5. Шевченко Н. М., Шаламай А. С., Усенко Л. С. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 976—978.
6. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 7235—7248.
7. Kataike K., Hasegawa Y., Ishido Y. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 1. P. 37—43.
8. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
9. Ломачин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 920—926.
10. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1—2. P. 429—432.
11. Кумарев В. И., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф., Кузнецов К. Д., Средин Ю. Г. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 276—278.

Поступила в редакцию  
17.VII.1989

После доработки  
28.XI.1989

E. ROZNER, A. REKIS, V. KUMPINŠ, E. BIZDENA

#### SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE H-PHOSPHONATE METHOD USING BASE-LABILE 2'-O-PROTECTING GROUPS. II. SOME ASPECTS OF USE OF 2'-O-BENZOYL AND ANISOYL PROTECTING GROUPS

Riga Polytechnical Institute

The N-acyl, 5'-O-trityl (MeOTr, (MeO)<sub>2</sub>Tr, Me<sub>3</sub>Tr), 2'-O-benzoyl (and anisoyl) nucleosides were prepared by selective aroylation of N,5'-protected nucleosides. By means of the reverse-phase microcolumn liquid chromatography it was shown that the rate of the aroyl 2' → 3'-isomerisation is lower in case of 2'-anisoylnucleosides and depends on structure of the 5'-O-protecting group. The prepared synthons were used for the manual H-phosphonate solid-phase synthesis of oligoribonucleotides (6—10-mers).