



УДК 547.963.32.07

© 1990 г.

*А. Г. Веняминава, В. В. Горн, М. А. Зенкова,
Н. И. Комарова, М. И. Реткова*

**АВТОМАТИЧЕСКИЙ Н-ФОСФОНАТНЫЙ СИНТЕЗ
ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
2'-О-ТЕТРАГИДРОПИРАНИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ**

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР

Описан автоматический синтез олигорибонуклеотидов заданного строения длиной 6—19 мономерных звеньев на синтезаторах типа «Виктория» с использованием *N*-ацил-5'-*O*-диметокситритил-2'-*O*-тетрагидропиранилрибонуклеозид-3'-*N*-фосфонатов и пивалоилхлорида как активирующего агента. Олигорибонуклеотиды получены с выходом 3—44% в расчете на первый нуклеозид, связанный с полимером.

Синтетические олигорибонуклеотиды все шире используются для решения ряда задач биоорганической химии и молекулярной биологии, таких, как изучение механизма биосинтеза белка, репликации вирусных РНК, сплайсинга пре-мРНК. Открытие рибозимных свойств у сравнительно коротких синтетических олигорибонуклеотидов [1, 2] еще более увеличило интерес исследователей к синтетическим олигорибонуклеотидам заданной последовательности.

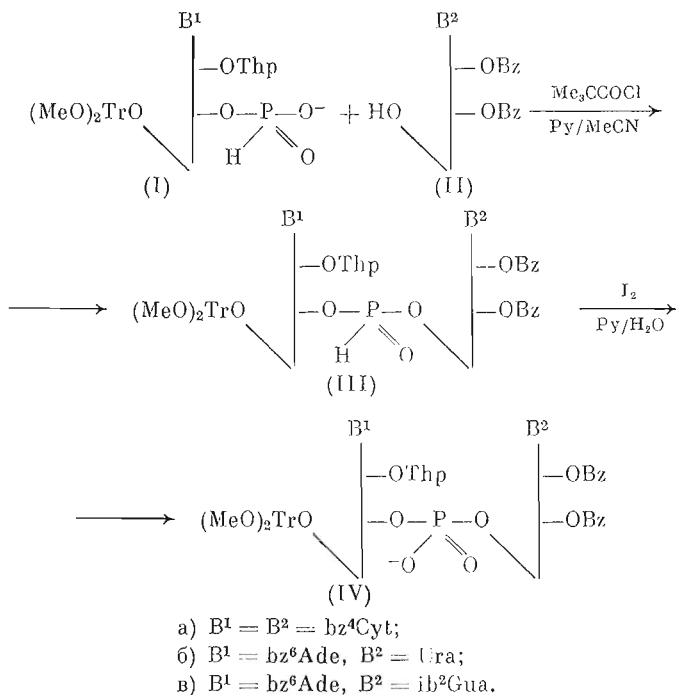
Наиболее эффективным методом химического синтеза олигонуклеотидов в настоящее время считается *N*-фосфонатный метод, сочетающий достоинства как фосфиттриэфирного, так и фосфодиэфирного методов, а именно: стабильность исходных синтонов, простой и эффективный способ их получения, доступный конденсирующий агент, высокую скорость реакции конденсации, малый расход реагентов, отсутствие защиты по межнуклеотидному фосфату и соответственно минимальное количество стадий, приводящих к целевому олигонуклеотиду. В то время как *N*-фосфонатным методом в дезоксириборяду получены олигонуклеотиды длиной до 100 звеньев (см., например, [3—11]), автоматический *N*-фосфонатный метод синтеза олигорибонуклеотидов развивается пока значительно медленнее [12—18]. Это, очевидно, связано со сложностью введения и удаления защитной группы у 2'-гидроксила. Тем не менее описан синтез олигорибонуклеотидов длиной до 21 звена с использованием для защиты 5'- и 2'-гидроксильных мономерных синтонов диметокситритильной и *трет*-бутилдиметилсилильной группы соответственно [12, 17]. Икехара с сотр. [13] синтезировал олигорибонуклеотиды длиной до 34 звеньев, применив для защиты 2'-ОН *o*-нитробензильную группу. В опубликованном нами ранее кратком сообщении [14] продемонстрирована возможность *N*-фосфонатного синтеза олигорибонуклеотидов с использованием 2'-*O*-тетрагидропиранильной группы. В данной работе описан автоматический *N*-фосфонатный метод синтеза олигорибонуклеотидов длиной до 19 звеньев на синтезаторах «Виктория 4М» и «Виктория-5».

Получение мономерных синтонов — 5'-*O*-диметокситритил-2'-*O*-тетрагидропиранил-*N*-ацилнуклеозид-3'-*N*-фосфонатов, основанное на исполь-

Сокращения: Py — пиримидин, TEAB — триэтиламонийбикарбонат, Thr — тетрагидропиранил, *PivCl* — пивалоилхлорид, *ib* — изобутирил, *B* — (не)защищенное гетероциклическое основание, ОФХ — обращенно-фазовая хроматография, ФДЭ — фосфодиэстераза.

зовании в качестве фосфорилирующего агента салицилоилхлорфосфина, описано нами ранее [19].

Схема 1



Для проверки реакционной способности синтезированных нуклеозид-Н-фосфонатов был проведен синтез ряда динуклеозид-Н-фосфонатов и соответствующих фосфатов в растворе (схема 1 и рис. 1). При добавлении 5 экв. PivCl к эквимольной смеси 3'-Н-фосфоната (Ia) и 5'-ОН-компонента (IIa) в спектре ^{31}P -ЯМР ($\text{MeCN} - \text{Py}$, 1 : 1) через 1—2 мин полностью исчезал сигнал исходного синтона (Ia) (δ 0,69 м.д.) и появлялись два сигнала, соответствующие диастереомерам динуклеозид-Н-фосфоната (IIIa, δ 9,35 и 8,8 м.д.) (рис. 1б). Последний при обработке реакционной смеси 0,2 М I_2 в смеси $\text{Py} - \text{H}_2\text{O}$, 98 : 2 [20], превращался в динуклеозидфосфат (IVa) (δ -0,55 м.д.) (рис. 1в). Характер изменения химических сдвигов и структура сигналов в нашем случае соответствовали ожидаемому и согласовывались с литературными данными [3].

На примере препаративного синтеза димера (IIIб) было показано, что хроматографией на силикагеле удается выделить такой динуклеозид-Н-фосфонат с высоким выходом. Это говорит о принципиальной возможности получения димерных Н-фосфонатных блоков для синтеза олигорибонуклеотидов (аналогичные результаты были приведены ранее [15]). Динуклеозидфосфат (IVв), образующийся в результате окисления соответствующего Н-фосфонатного димера (IIIв), также был выделен с высоким выходом с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Полученные данные о высокой реакционной способности синтезированных мономеров позволили перейти к разработке схемы твердофазного синтеза олигорибонуклеотидов. Известно, что при синтезе в риборяду важен выбор 2'-О-защитной группы. Используемое нами сочетание 5'-О-диметокситрильной и 2'-О-тетрагидропиранильной групп, т. е. двух кислотоллабильных групп различной устойчивости, позволяет деблокировать только 5'-гидроксил для последующего наращивания олигонуклеотидной цепи, а при необходимости удалять обе группы одновременно. Существенным достоинством Thp-группы является отсутствие 2',3'-миграции этой группы при синтезе и выделении соответствующих синтонов. Основная опасность при твердофазном синтезе олигорибонуклеотидов

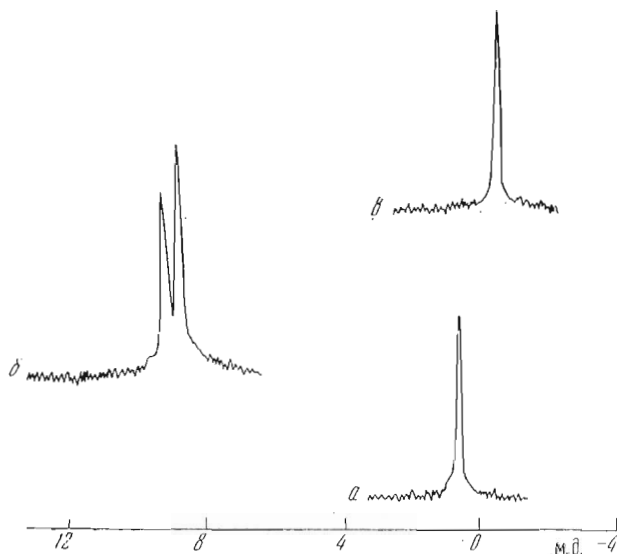


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР: а — нуклеозид-Н-фосфоната (Ia), б — динуклеозид-Н-фосфоната (IIIa), в — динуклеозидфосфата (IVa)

с применением данных защитных группировок — возможность частичного отщепления Thr-группы при многократном 5'-О-детритилировании. Специальными опытами (данные не приводятся) нами было показано, что использование для гидролиза 1% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2 (2 мин) позволяет свести эту опасность к минимуму. Как следует из работы [21], а также из работ Хаты (см., например, [22, 23]), в случае, если происходит частичное снятие Thr-группы с растущей олигонуклеотидной цепи, в процессе дальнейшего синтеза и последующих обработок происходит частичный разрыв межнуклеотидных связей с образованием более коротких фрагментов, которые можно довольно легко отделить от целевого олигонуклеотида. Сочетание двух кислотолabileльных защитных групп различной устойчивости успешно применялось ранее для синтеза олигорибонуклеотидов среднего размера фосфотриэфирным и фосфиттриэфирным методами в растворе (см., например, [22, 24]) и на полимере (например, [24—28]); для автоматического Н-фосфонатного синтеза такое сочетание, насколько нам известно, ранее не применялось.

В качестве полимерного носителя для твердофазного синтеза было выбрано пористое стекло CPG-500 и LCA-CPG-500. Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена проводили согласно работам [29, 30].

Пригодность полученных мономерных синтонов для твердофазного автоматического синтеза была показана на примере получения U_5C и U_6 на серийном синтезаторе «Виктория-4М». При работе по стандартной схеме [14] на этом синтезаторе не удается достичь высоких выходов. Модификация схемы синтезатора и тщательной подбор программы работ позволили обеспечить подачу нуклеозид-Н-фосфоната (I) и PivCl чередующимися порциями [5, 11] (табл. 1). На примере синтеза гомоолигонуклеотидов было показано и подтверждено при синтезе гетероолигонуклеотидов, что изменения концентрации фосфоната (I) от 0,05 до 0,025 M, а также уменьшение избытка PivCl от 5- до 3-кратного не приводят к существенному уменьшению выхода олигонуклеотида. Цикл наращивания цепи на один мономер состоял из двух стадий и заключался в селективном удалении $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -группы с 5'-конца растущей олигонуклеотидной цепи и в конденсации с соответствующим 3'-Н-фосфонатом (I) в присутствии PivCl (схема 2). Общее время цикла, включая промывки, составляло 8 мин. После проведения нужного числа циклов защищенный олигонуклеозид-Н-фосфонат, связанный с полимером (V), подвергали окислению

Цикл межнуклеотидной конденсации на синтезаторе «Виктория-4М»

Операция	Реагент	Объем, мкл	Время, мин
Деблокирование	1% $\text{Cl}_2\text{CHCO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2	2000	2
Промывка	MeCN	1000	0,5
Дозирование мономера и активирующего агента	0,025 М мономер и 0,075 М PivCl в MeCN - Py (1:1) или 0,05 М мономер и 0,15 М PivCl в MeCN - Py (1:1)	3 раза порциями по 60 мкл каждого	2
Конденсация			3
Промывка	MeCN	1000	0,5

* Время цикла 8 мин. Скорость подачи растворителей 2 мл/мин.

Таблица 2

Обращенно-фазовая МКХ гидролизатов олигорибонуклеотидов (ФДЭ+5'-нуклеотидаза из яда кобры)

Соединение	C			U			G			A		
	τ , мин	$\frac{A_{230}/A_{260}}{A_{230}/A_{260}}$	Содержание, моль/моль	τ , мин	$\frac{A_{230}/A_{260}}{A_{230}/A_{260}}$	Содержание, моль/моль	τ , мин	$\frac{A_{230}/A_{260}}{A_{230}/A_{260}}$	Содержание, моль/моль	τ , мин	$\frac{A_{230}/A_{260}}{A_{230}/A_{260}}$	Содержание, моль/моль
(VI) UUUUC	5,8	0,98	1,0	7,2	0,76	4,6						
(VIII) UCUACCCA	5,6	1,10 0,82	4,0	7,1	0,34 0,71	2,4				12,3	0,78	2,0
(IX) UAUA AUGC	5,9	0,99 0,82	1,0	7,5	0,36 0,76	3,3	10,9	1,15 0,66	0,9	12,3	0,15 0,79	2,6
(X) AUAAGGAG		0,99		7,4	0,35 0,75	1,0	10,7	1,15 0,67	2,7	12,5	0,15 0,80	3,9
(XI) AUGCCGCG	5,7	0,85 1,00	2,6	7,3	0,35 0,80	1,3	10,7	1,16 1,16	3,0	12,9	0,18 0,78	1,0
Нуклеозиды-маркеры	6,1	0,83 0,99		7,6	0,75 0,34		10,9	1,15 0,66		12,7	0,16 0,79	

* Условия гидролиза и хроматографии см. в «Экспер. части». Приведены характеристики пиков соответствующих нуклеозидов.

[20] до соответствующего фосфата, удаление которого с полимера и гидролиз всех защитных групп осуществляли в стандартных условиях. В результате двух последовательных хроматографий получали целевые олигонуклеотиды в виде литиевых солей (рис. 2 и 3).

Хроматографически чистые олигорибонуклеотиды подвергали действию смеси фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры и последующей обращенно-фазовой МКХ, получая при этом ожидаемые мономеры в ожидаемом соотношении. В табл. 2 и на рис. 4 в качестве примера приведены результаты определения нуклеотидного состава ряда синтезированных гекса- и октануклеотидов.

Из данных по определению нуклеотидного состава синтезированных олигорибонуклеотидов в сочетании с результатами исчерпывающего гидролиза их соответствующими рибонуклеазами (см., например, рис. 5а, б и результаты гидролиза U_6) следует, что в синтезированных по данной схеме олигорибонуклеотидах отсутствуют заметные примеси олигонуклеотидов с модифицированными основаниями или изомеризованными межнуклеотидными связями.

На «Виктории-4М» с модифицированной схемой был получен ряд гомоолигонуклеотидов длиной до 10 звеньев, 11—14-звенные фрагменты фенилаланиновой тРНК *E. coli*, а также 15- и 19-звенные фрагменты РНК,

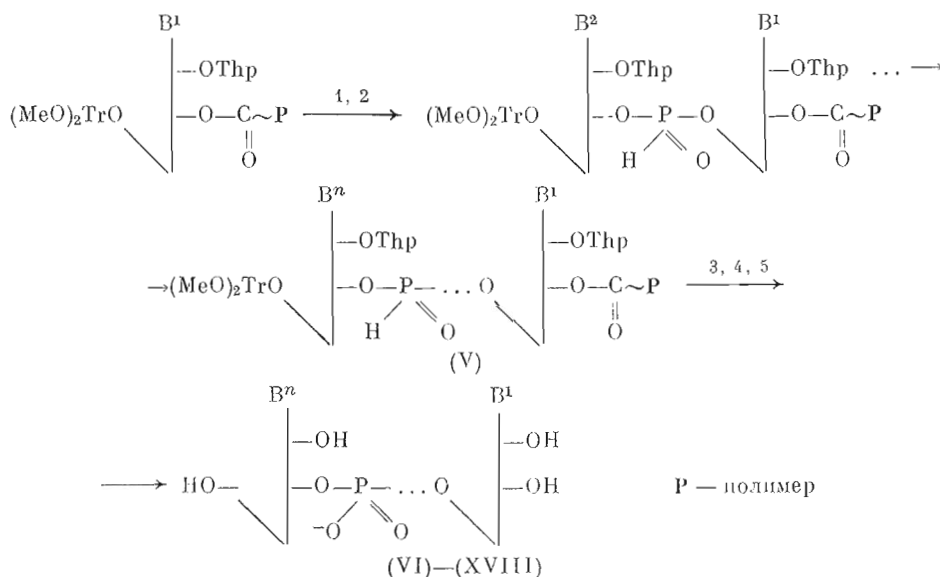
Выходы синтезированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	Число звеньев	Выход **		
		на стадии, %	общий, %	ОЕ ₂₆₀
(VI) UUUUUC	6	55	5	1
(VIIa) U ₆	6	54	5	1
(VIIб) U ₁₀	10	84	21	9
(VIII) UCUACCCA	8	71	9	3
(IX) UAUAAUGC	8	73	11	5
(X) AUAAGGAG	8	72	10	4
(XI) AUGCCGCG	8	70	8	3
(XII) UUCAAGGC	8	89	44	10
(XIII) UAUAAUGCCGCG	12	81	10	4
(XIV) UCCGGGCACCA *	11	86	23	4
(XV) GAUUGAAAAUCCCC	14	79	5	4
(XVI) ACUCCUGAUGACACG	15	78	3	1
(XVII) UGCUCUGAUGAAGUG	15	78	3	1
(XVIII) GGUGCUCUGAUGAAGUGGA *	19	87	9	2

* В качестве полимера для твердофазного синтеза использовали пористое стекло LCA-CPG, в остальных случаях CPG.

** Выход олигонуклеотидов, полученных в результате двух последовательных хроматографий, рассчитывали, принимая гипохромный эффект равным 25% [28].

Схема 2



- 1) 1% CHCl₂CO₂H в CH₂Cl₂, 2 мин;
- 2) (I) и PivCl в Py — MeCN (1:1), 3 мин;
- 3) 0,2 M I₂ в Py — H₂O (98:2), 30—60 мин;
- 4) NH₄OH, 55° C, 8—16 ч;
- 5) 0,01 н. HCl, 50° C, 2 ч.

комплементарные консенсусным последовательностям в кДНК вируса клещевого энцефалита. Октануклеотиды — рибоаналоги *src*-промотора *E. coli* — были получены на синтезаторе следующего поколения — «Виктория-5», гидравлическая система которого позволяет практически полностью исключить возможность смешивания реагентов и растворителей, а также существенно увеличить скорость подачи растворителей. Выходы синтезированных олигорибонуклеотидов приведены в табл. 3. Для подтверждения первичной структуры олигорибонуклеотидов использовали метод Донис-Келлер [31] (рис. 5).

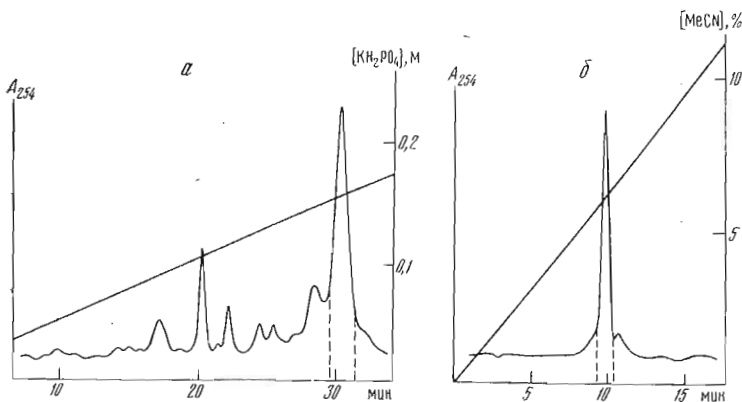


Рис. 2

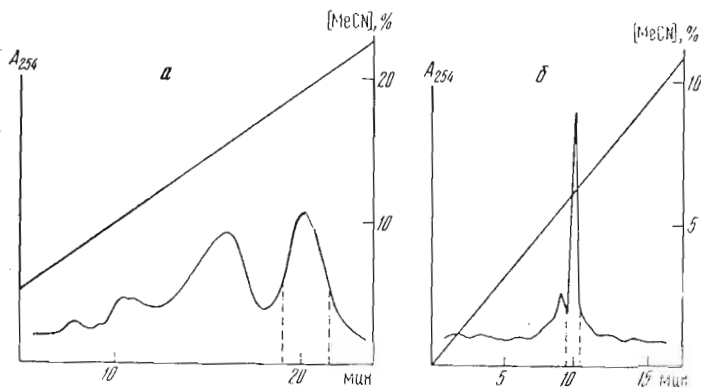


Рис. 3

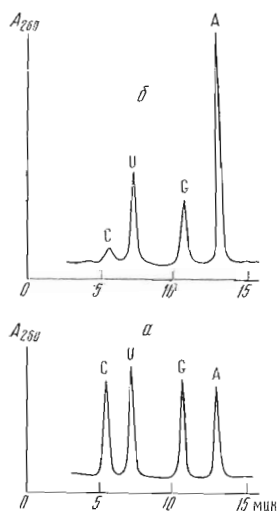


Рис. 4

Рис. 2. ВЭЖХ реакционных смесей при синтезе UUCAAGGC: *a* — ионообменная хроматография на Полисил-СА, *б* — ОФХ на Lichrosorb RP-18 (условия см. «Экспер. часть»)

Рис. 3. ВЭЖХ реакционных смесей при синтезе GGUGCUCUGAUGAAGUGGA (XVIII) ОФХ на Lichrosorb RP-18 до удаления 5'-О-диметокситритильной группы (*a*) и после удаления 5'-О-диметокситритильной группы (*б*) (условия см. «Экспер. часть»)

Рис. 4. ОФ МКХ гидролизата (ФДЭ + 5'-нуклеотидаза яда кобры) нуклеотида UAUAAUGC (IX) (*б*); *a* — нуклеозиды-маркеры (условия см. «Экспер. часть»)

Таким образом, продемонстрирована возможность Н-фосфонатного синтеза олигорибонуклеотидов среднего размера на синтезаторах типа «Виктория» с использованием сочетания 5'-О-диметокситритильной и 2'-О-тетрагидропиранильной защитных групп.

Экспериментальная часть

В работе использовали рибонуклеозиды и диметокситритилхлорид (НПО «Биолар», Олайне), 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопротилдисулфоксан (Sigma, США), пивалоилхлорид, дихлоруксусную кислоту (Fluka, Швейцария).

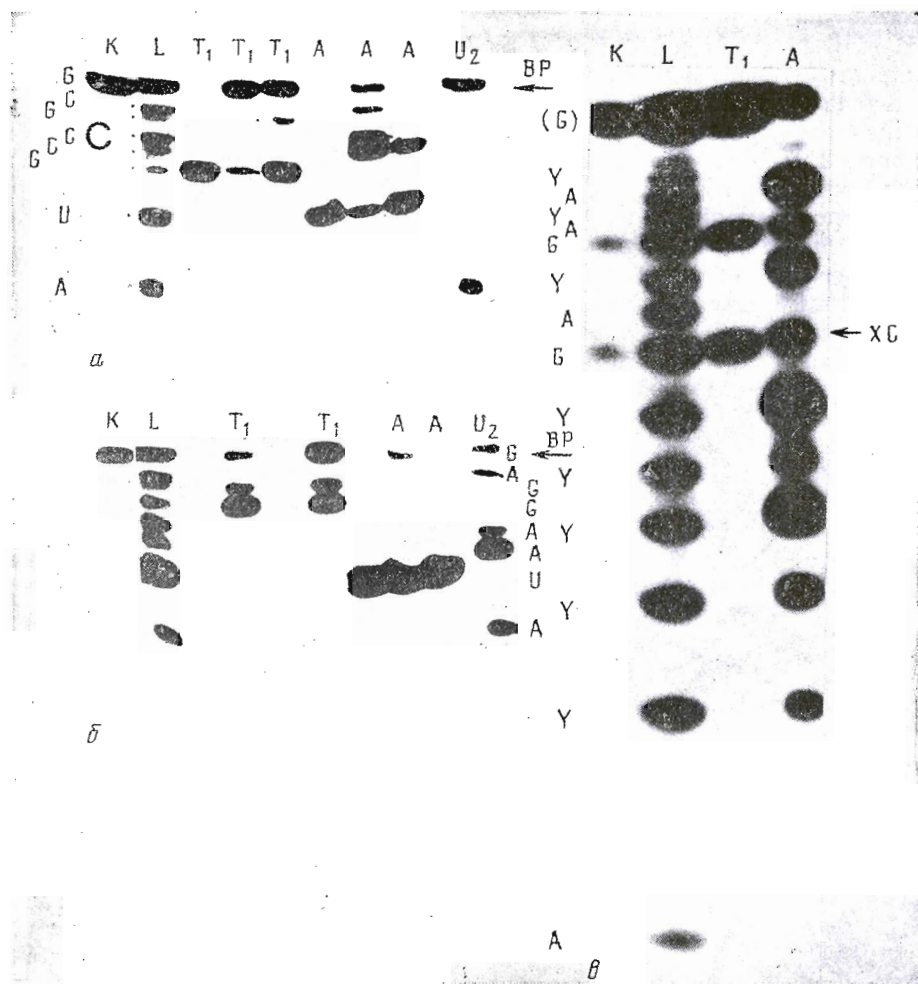


Рис. 5. Радиоавтограммы полиакриламидных гелей при определении первичной структуры AUGCCGCC (X1) (а), AUAAGGAG (X) (б), ACUCCUGAUGACACG (XVI) (в) по методу Донис — Келлер. К — контроль; L — ограниченный щелочной гидролиз; T₁, A и U₂ — гидролиз соответствующими нуклеазами. Указано положение маркерных красителей — бромфенолового синего (BP) и ксиленцианола (XC)

Безводные растворители готовили стандартными методами.

N-Ацил-5'-O-диметокситритил-2'-O-тетрагидропиранилрибонуклеозиды получали по методу [24], N⁴,2',3'-O-трибензоилцитидин и 2',3'-ди-O-бензоилуридин по методу [32], N²-изобутирил-2',3'-ди-O-бензоилгуанозин по методу [33]. Синтез N-ацил-5'-O-диметокситритил-2'-O-тетрагидропиранилрибонуклеозид-3'-H-фосфонатов проводили по методу, описанному нами ранее [19].

Для автоматического синтеза олигорибонуклеотидов использовали синтезаторы «Виктория-4М» и «Виктория-5» производства СКТБ спецэлектроники и аналитического приборостроения СО АН СССР.

В качестве полимерного носителя использовали стекло CPG-500 (120—200 меш, Fluka, Швейцария) и LCA-CPG-500 (80—120 меш, Sigma, США). Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена проводили как описано в работах [29, 30]. Количество введенного нуклеозиды составляло в среднем соответственно 30 и 15 мкмоль/г.

Для ТСХ использовали DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck) и системы растворителей: этанол — хлороформ, 1 : 9 (А), этанол — хлороформ — триэтиламин, 4 : 5,9 : 0,1 (Б).

Препаративную ВЭЖХ олигонуклеотидов проводили на хроматографе Altex, используя для ионообменной хроматографии колонку (4,6 × × 250 мм) с Полисил-СА [34] и градиент концентрации КН₂РО₄ (0—0,3 М

в 30% MeCN) либо градиент концентрации KH_2PO_4 и $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,02 M KH_2PO_4 в 30% MeCN — 0,2 M KH_2PO_4 + 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ в 30% MeCN). Скорость элюции 3 мл/мин. Для обращенно-фазовой хроматографии использовали колонку (4,6 × 250 мм) с Lichrosorb RP-18 (Merck) и градиент концентрации ацетонитрила (0—20%) в 0,05 M растворе LiClO_4 . Скорость элюции 2 мл/мин. Олигорибонуклеотиды выделяли в виде литиевых солей осаждением из водного раствора в 2% раствор LiClO_4 в ацетоне [35].

Микроколоночную хроматографию гидролизатов олигонуклеотидов проводили на хроматографе «Милихром». Для разделения использовали колонку (2 × 62 мм) с сорбентом Nucleosil C_{18} (5 мкм, Macherey-Nagel) и градиент концентрации MeOH (0 — 80%) в 0,02 M трис-ацетате, pH 5,0, со скоростью потока 100 мкл/мин. Для получения хроматографических данных в режиме детекции на шести длинах волн со спектрофотометрического детектора хроматографа «Милихром» использовали систему сбора и обработки данных на базе микро-ЭВМ «Электроника-60М» [36].

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 (Bruker) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта. Диаметр ампулы 10 мм. Спектры записывали с подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - ^1H и без него. Использовали 0,1 M растворы исследуемых веществ в смеси $\text{Pu} - \text{MeCN}$, 1 : 1. Ампулы заполняли аргоном.

Для ферментативного гидролиза использовали рибонуклеазу А (КФ 3.1.27.5, Miles), рибонуклеазы T_1 (КФ 3.1.27.3), T_2 (КФ 3.1.27.1) и U_2 (КФ 3.1.27.4, Pharmacia), а также фосфодиэстеразу (КФ 3.1.4.1) и 5'-нуклеотидазу (КФ 3.1.3.5) из яда кобры (*Naja naja oxiana*), любезно предоставленные В. И. Ямковым (Новосибирский университет).

^{32}P -Метку по 5'-концу олигорибонуклеотидов вводили с помощью [γ - ^{32}P]АТР (уд. акт. >1000 Ки/ммоль) и Т4-полинуклеотидкиназы (НПО «Фермент», Вильнюс), как описано в работе [31]. Меченые олигонуклеотиды очищали до гомогенного состояния с помощью денатурирующего электрофореза в 20% ПААГ. Первичную структуру меченых олигонуклеотидов определяли по методу [31] с использованием рибонуклеаз А, T_1 и U_2 .

Динуклеозид-Н-фосфонат (IIIб). Предварительно высушенные 0,092 г (0,11 ммоль) 5'-O-(MeO) $_2$ Tr-2'-O-Thr-N 6 -бензоиладенозин-3'-H-фосфоната (Iб) и 0,05 г (0,11 ммоль) 2',3'-ди-O-бензоилуридина (IIв) растворяли в 2,2 мл смеси $\text{Pu} - \text{MeCN}$ (1 : 1) и добавляли 0,067 мл (0,55 ммоль) пивалоилхлорида. За ходом реакции следили методом ТСХ (система А). Через 2 мин к реакционной смеси добавляли равный объем 1 M ТЕАВ и экстрагировали хлороформом (3 × 10 мл). Динуклеозид-Н-фосфонат (IIIб) выделяли хроматографией на силикагеле L100/250 (Chemapol) в линейном градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—5%). Общий объем элюента 500 мл. Фракцию, соответствующую основному продукту (R_f 0,45 А), упаривали несколько раз с абс. MeCN. Выход соединения (IIIб) 0,12 г (90%). Пятно вещества при ТСХ давало сиреневую окраску с нингидрином, характерную для Н-фосфонатов [32]. Окисление соединения (IIIб) приводило к продукту с нулевой подвижностью при ТСХ (система А).

Динуклеозидфосфат (IVв). Предварительно высушенные 0,20 г (0,22 ммоль) 5'-O-(MeO) $_2$ Tr-2'-O-Thr-N 6 -бензоиладенозин-3'-H-фосфоната (Iв) и 0,13 г (0,22 ммоль) N 2 -изобутирил-2',3'-ди-O-бензоилгуанозина (IIв) растворяли в 4,4 мл смеси $\text{Pu} - \text{MeCN}$ (1 : 1) и добавляли 0,134 мл (1,1 ммоль) пивалоилхлорида. За ходом реакции следили методом ТСХ (система А). Через 20 мин к реакционной смеси добавляли 2 мл 0,2 M раствора I_2 в пиридине и 0,2 мл H_2O . В случае исчезновения окраски иода процедуру окисления повторяли. Окисленную реакционную смесь упаривали до маслообразного состояния, добавляли равный объем 1 M ТЕАВ и несколько кристаллов тиосульфата натрия для обесцвечивания раствора. Хроматографировали на колонке с Silasorb C_{18} (100 мл, 15 мкм, Chemapol) в линейном градиенте концентрации этанола (20—60%) в 0,01 M ТЕАВ, pH 8. Объем элюента 500 мл. Фракцию, содержащую це-

левой продукт ($R_f = 0$, А; $R_f = 0,60$, Б), упаривали с добавлением этанола и абс. MeCN. Выход 0,29 г (86%).

Удаление защитных групп (конц. NH_4OH , 55°C , 16 ч; 0,01 н. HCl , 50°C , 2 ч) у полученного динуклеозидфосфата (IVв) и гидролиз РНКазой T_2 [30] с последующей МКХ приводили к соотношению Ар : G = 1 : 0,9.

Автоматический синтез олигорибонуклеотидов. Для синтеза использовали 15 мг полимера с присоединенным первым нуклеозидом. Реактор заполняли на $\frac{2}{3}$ объема. Последовательность и время операций приведены в табл. 1. Детритилировали 1% раствором дихлоруксусной кислоты в дихлорметане (промывка кислотой 40 с, пауза 40 с, промывка кислотой 40 с). Для реакции конденсации использовали 0,025 или 0,05 М растворы нуклеозид-Н-фосфоната (20 или 40 экв) и 0,075 или 0,15 М растворы пивалоилхлорида (60 или 120 экв.). Время реакции 3—4 мин. Растворы мономера и PivCl подавали чередующимися порциями (3 раза по 60 мкл каждого). После синтеза полимер обрабатывали 30—60 мин свежеприготовленным 0,2 М I_2 в смеси $\text{Pu} - \text{H}_2\text{O}$ (98 : 2), промывали ацетоном и высушивали.

Удаление защитных групп и выделение олигорибонуклеотидов. а) Полимер с присоединенным олигорибонуклеотидом (VI)—(XVII) смачивали этанолом, добавляли 1—2 мл конц. NH_4OH (d 0,89) и выдерживали 8—16 ч при 55°C . Раствор декантировали, полимер несколько раз промывали этанолом, водно-этанольный раствор упаривали досуха, добавляли 1 мл 0,01 н. HCl (рН 2) и выдерживали 2 ч при 50°C . Нейтрализовали разбавленным NH_4OH , центрифугировали, супернатант нанесли на колонку с Полисил-СА [24] и проводили ионообменную ВЭЖХ. Фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали, растворяли в воде и подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ с последующим выделением олигонуклеотидов в виде литиевых солей.

б) Полимер с присоединенным олигонуклеотидом (XVIII), содержащим 5'-O-(MeO) $_2$ Tr-группу, смачивали этанолом, добавляли 1—2 мл конц. NH_4OH (d 0,89). Выдерживали 16 ч при 55°C , декантировали раствор, полимер несколько раз промывали этанолом, к раствору добавляли 0,1 мл 0,1 М трис- HCl (рН 10) и упаривали досуха. Остаток растворяли в воде и проводили обращенно-фазовую хроматографию в градиенте концентрации ацетонитрила (0—30%) в 0,05 М растворе LiClO_4 , доводя рН элюента добавлением триэтиламина до 8. Фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали, выдерживали 2 ч при рН 2 и 50°C , затем нейтрализовали разбавленным NH_4OH и проводили обращенно-фазовую хроматографию с последующим выделением олигонуклеотида в виде литиевой соли. Более детальное описание хроматографии и выделения см. выше.

Ферментативный гидролиз. а) К 100 мкл воды добавляли 0,2 ОЕ $_{260}$ олигонуклеотида в 2 мкл H_2O , 6 мкл 0,5 М трис- HCl (рН 8,5), содержащего 0,025 М MgCl_2 , и 12 мкл смеси ФДЭ и 5'-нуклеотидазы из яда кобры в 0,02 М трис- HCl в 50% глицерине. Смесь инкубировали 1,5 ч при 20°C . Количественный анализ гидролизатов проводили как описано выше (табл. 2).

б) 0,2 ОЕ $_{260}$ нуклеотида U_6 и 3 мкл рибонуклеазы А в 100 мкл 0,01 М TEAB (рН 7,5) инкубировали ночь при 20°C , прогревали 5 мин при 100°C и подвергали обращенно-фазовой МКХ; найдено $\text{Ur} : \text{U} = 5,1 : 1$.

Авторы благодарят Т. В. Абрамову за синтез исходных синтонов, А. С. Буторина и Н. Ю. Матвпенко за установление первичной структуры пентадека- и нонадекамеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uhlenbeck O. C. // *Nature*. 1987. V. 328. № 6131. P. 596—599.
2. Jeffries A. C., Symons R. H. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 4. P. 1371—1377.
3. Froehler B. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
4. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
5. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R., Hencichson C. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4054.

6. Тоѝк Z., Arnold L., Smrt J. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. № 18. 1987. P. 193—196.
7. Gaffney B. L., Jones R. A. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 22. P. 2619—2622.
8. Sinha N. D., Cook R. M. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 6. P. 2659—2669.
9. Кумарев В. П., Барапова Л. В., Кобзев В. Ф., Кузнецов К. Д., Средин Ю. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 276—278.
10. Давыков Ю. В., Батчигов Н. В., Скапцова Н. В., Бесидский Е. С., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 615—620.
11. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калининченко С. В., Добрынин В. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 15. № 4. С. 527—529.
12. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R., Henrichson C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4055—4058.
13. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 7235—7248.
14. Веньяминова А. Г., Левина А. С., Косолапова Э. А., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1588—1590.
15. Jäger A., Charubala R., Pfeleiderer W. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. № 18. 1987. P. 197—200.
16. Шевченко Н. М., Шаломай А. С., Усенко Л. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 976—978.
17. Stawinski J., Strömberg R., Thelin M., Westman E. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 19. P. 9285—9298.
18. Рознерс Э. Э., Кумпильш В. Х., Рекис А. Х., Биздена Э. О. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1580—1582.
19. Веньяминова А. Г., Комарова Н. И., Левина А. С., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 484—489.
20. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1987. № 6. P. 1269—1273.
21. Huss S., Gosselin G., Stawinski J., Strömberg R., Imbach J.-L. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 3. P. 321—337.
22. Tanimura H., Sekine M., Hata T. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 4. P. 363—383.
23. Tanimura J., Sekine M., Hata T. // Chem. Lett. 1987. № 6. P. 1057—1060.
24. Markiewicz W. T., Biala E., Kierzek R. // Bull. Acad. pol. sci. Ser. sci. chim. 1984. V. 32. № 11—12. P. 433—451.
25. Hirao I., Ishikawa M., Miura K. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. № 16. 1985. P. 173—176.
26. Seliger H., Zah D., Azuri G. // Chem. scr. 1983. V. 22. N 22. P. 95—101.
27. Kierzek R., Caruthers M. H., Longfellow C. E., Swinton D., Turner D. H., Freier S. M. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 24. P. 7840—7846.
28. Tanimura H., Fukasawa T., Sekine M., Hata T., Efcavitch J. W., Zon G. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 5. P. 577—578.
29. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 10. С. 1361—1381.
30. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 920—926.
31. Donnis-Keller H., Mazam A., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527—2538.
32. Rammler D. H., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. V. 84. № 17. P. 3112—3122.
33. Ohtsuka E., Nakagawa E., Tanaka T., Markham A. F., Ikehara M. // Chem. Pharm Bull. 1978. V. 26. № 10. P. 2998—3006.
34. Ястребов С. И. Способ получения сорбента. А.с. 1153976 СССР // Б.И. 1985. № 17. С. 28.
35. Барам Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420—1422.
36. Varan G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov J. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69—90.
37. Предводителев Д. А., Иванов В. И., Аларкон Х. Х., Нифантьев Э. Е. // Журн. общ. химии. 1978. Т. 48. № 6. С. 1273—1276.

Поступила в редакцию
12.IX.1989

A. G. VENIAMINOVA, V. V. GORN, M. A. ZENKOVA, N. I. KOMAROVA,
M. N. REPKOVA

AUTOMATED H-PHOSPHONATE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES USING 2'-O-TETRAHYDROPYRANYL PROTECTING GROUP

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

Using N-acyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydropyranyl-3'-H-phosphonates and pivaloyl chloride as activating agent, a series of oligoribonucleotides 6—19 nucleotides long have been prepared on the automatic synthesizer «Victoria» with overall yields 3—44%.