



УДК 547.963.32.057

© 1992 г.

*Э. Рознерс, Р. Рейхоф, И. Циеленс\*,  
В. Кумпиньш\*, Э. Виздена*

## СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЩЕЛОЧНОЛАБИЛЬНЫХ

### 2'-О-ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

#### IV\*. НОВЫЙ ПОДХОД К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ МОДИФИКАЦИИ И ДЕГРАДАЦИИ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

*Рижский технический университет;*

*\*Институт молекулярной биологии АН Латвии, Рига*

Предложен метод синтеза олигорибонуклеотидов с использованием в качестве мономерных синтонов N-изопропоксиацетил-2'-О-(2-хлорбензоил)-5'-О-диметокситритилнуклеозид-3'-О-(Н-фосфонатов). Разработан новый метод синтеза упомянутых Н-фосфонатов в одну стадию из N,5'-О-защищенных нуклеозидов. Применение удаляемых в мягких щелочных условиях (конц. аммиак, 18–20°С) N-изопропоксиацетильной и 2'-О-(2-хлорбензоильной) защит позволяет устранить деградацию и модификацию олигорибонуклеотидов во время конечной стадии деблокирования.

Ранее [2, 3] мы сообщили о применении в качестве мономерных синтонов для синтеза олигорибонуклеотидов N-ацил-2'-О-бензоил (или анизоил)-5'-О-триметилнуклеозид-3'-О-(Н-фосфонатов). Для защиты экзоциклических аминофункций применялись традиционные бензоильная (для аденозина и цитидина) и изобутирильная (для гуанозина) группы: в качестве 5'-О-защиты почти с одинаковым успехом применены монометокси-, диметокси- и триметилтриметильные группы. Привлекательность метода заключается в простом и экономичном синтезе мономерных синтонов. Основные недостатки — возможность 2' → 3'-миграции бензоильной группы в промежуточных N,2',5'-О-защищенных нуклеозидах и возможная деградация олигонуклеотида в ходе последней стадии деблокирования в щелочной среде.

На начальных этапах исследований главное внимание было обращено на устранение возможности образования 3'-ароилизомера и, как следствие, 2' → 5'-олигонуклеотидных связей. Была достигнута высокая селективность бензоилирования, разработан подходящий метод выделения 2'-ароилнуклеозидов, и в результате систематических исследований [1] показано, что опасность изомеризации можно свести к минимуму подбором оптимальной комбинации 5'-О-триметильных и 2'-О-ароильных групп. В настоящей работе целевые 2'-О-ацил-3'-О-(Н-фосфонаты) синтезировались из исходных N,5'-О-защищенных нуклеозидов без выделения промежуточных 2'-О-ароильных производных, что позволило полностью устранить возможность миграции ароильных групп.

Труднее оказалось решить вторую проблему. Использование традиционных для отщепления бензоильной и изобутирильной группы условий (конц. аммиак, 50°С, 6–12 ч) приводит к полной деградации олигомера. Кемпе и сотр. [4] значительно снизили степень деградации, применяя для деацилирования смесь *n*-бутиламин — метанол — диоксан, 1:1:2

\* Сообщение III см. [1]. Сокращения: DMTr — диметокситритил, ipa — изопропоксиацетил.



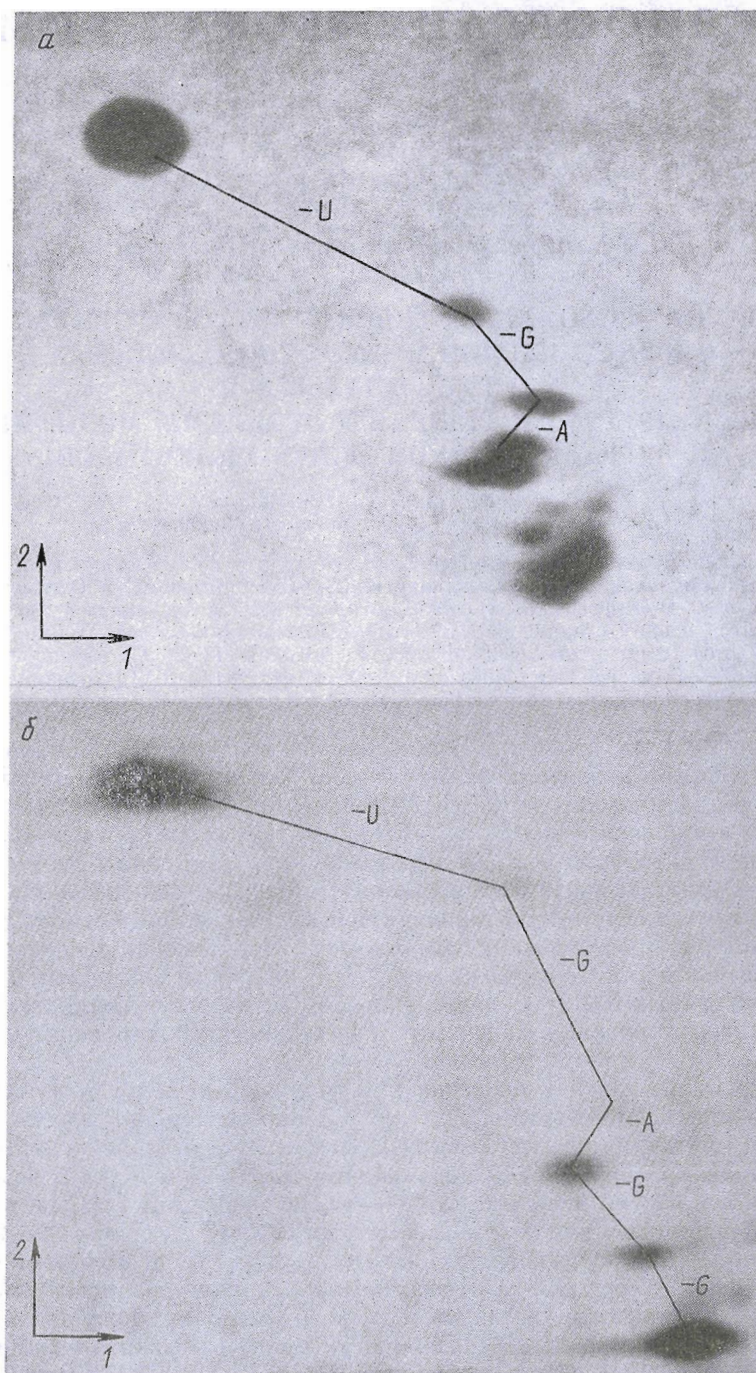


Рис. 1. Двумерное разделение гидролиза рибонуклеазы P<sub>1</sub> <sup>32</sup>pAUGAGG, синтезированного по методу А (а) и по методу В (б), выделенных ионообменной хроматографией (условия см. рис. 2а) в стандартных условиях секвенирования: 1-е направление – электрофорез на целлюлозоацетатной пленке (30 мин, 1800 В), 2-е направление – гомохроматография при 60°С на полиэтиленимин-тонком слое (100 мМ, 1 ч, 3%)



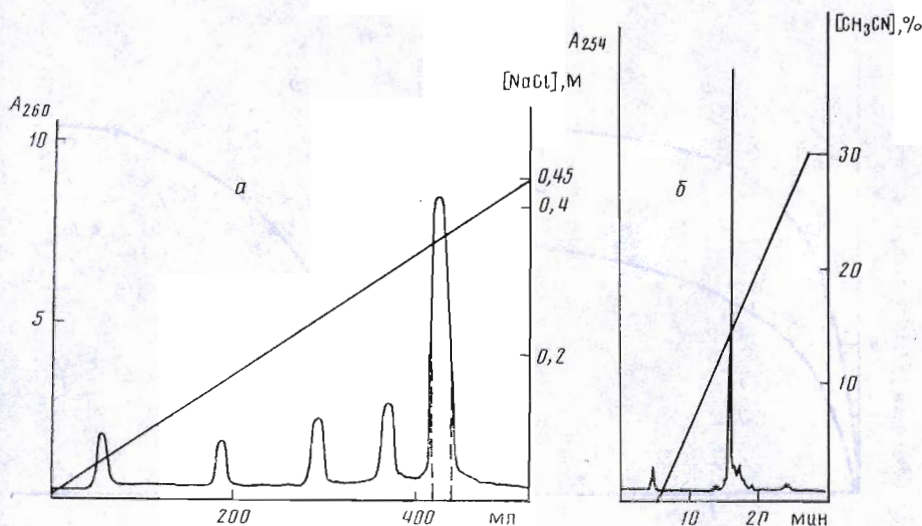


Рис. 2. Выделение из реакционной смеси олигорибонуклеотида AUGAGG, полученного по методу Б, хроматографией на DEAE-сефадексе (9×300 мм). *a* – элюирование (20 мл/ч) линейным градиентом концентрации NaCl в 0,01 М трис-HCl-буфере (pH 7,6), содержащем 7 М мочевины; *б* – анализ выделенной фракции ВЭЖХ: колонка ProRPC HR 5/10 (5×100 мм), элюирование (1 мл/мин) линейным градиентом концентрации ацетонитрила в триэтиламонийацетатном буфере, pH 6,95

(40° С, 7 ч). Мы также использовали этот метод и синтезировали ряд олигорибонуклеотидов [2, 3]. Реакционные смеси дали удовлетворительные профили ионообменной хроматографии: анализ ферментативных гидролизатов подтверждал отсутствие 2'→5'-межнуклеотидных связей. Проведенные для некоторых олигорибонуклеотидов исследования матричной активности в рибосомных комплексах *in vitro* дали положительные результаты.

Однако при секвенировании и тщательном исследовании полученных препаратов методами ПААГ-электрофореза, обращенно-фазовой ВЭЖХ была обнаружена неоднородность олигонуклеотидов.

В настоящей работе в качестве примера мы представляем результаты анализа одного из синтезированных нами упомянутым методом [2, 3] (далее – метод А) олигорибонуклеотидов – наиболее всесторонне изученного гексануклеотида AUGAGG.

Картина секвенирования (рис. 1а) AUGAGG, синтезированного методом А, после выделения ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (условия см. рис. 2) [3] указала на неоднозначность структуры. Дополнительные полосы были обнаружены также на электрофореграммах других олигорибонуклеотидов, синтезированных методом А.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что при деблокировании *n*-бутиламином не удается избежать модификации и деградации олигорибонуклеотида. Решение проблемы, на наш взгляд, заключается в применении N- и 2'-О-защит, удаляемых раствором аммиака, но в более мягких условиях, чем традиционные бензоильные и изобутирильные группы, что позволило бы избежать модификации и деградации олигорибонуклеотида.

Для защиты экзоциклических аминогрупп нуклеиновых оснований недавно были предложены феноксиацетиловая [5–8] и изопроксиацетиловая [9] группы, удаление которых проводят концентрированным водным раствором аммиака в течение нескольких часов при комнатной температуре. Мы начали наши исследования с изопроксиацетиловой

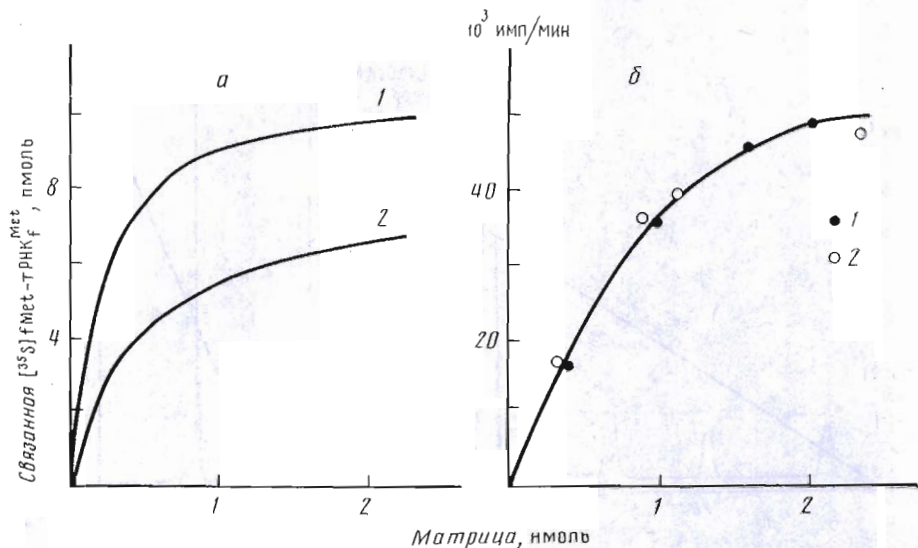
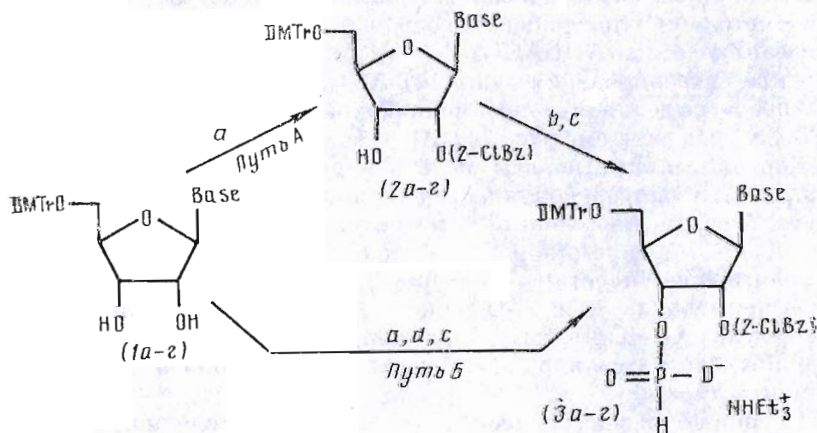


Рис. 3. Связывание меченой  $[^{35}\text{S}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$  в комплекс инициации биосинтеза белка *in vitro* с триплетом AUG (Boehringer M) (1) и синтетическим гексануклеотидом AUGAGG (2), полученным по методу (А) (а) и Б (б) (после выделения ионообменной хроматографией на сефадексе А-25, условия см. рис. 2)

группы. Ориентируясь на широкий экспериментальный материал о селективности введения, скорости  $2' \rightarrow 3'$ -миграции [1, 3] и основываясь на дополнительных исследованиях условий удаления различных ароматических групп, мы выбрали 2-хлорбензоильную группу как наиболее подходящую для защиты  $2'$ -ОН. Выбор обусловлен высокой селективностью введения, с одной стороны, и достаточно мягкими условиями удаления (25%  $\text{NH}_3/\text{EtOH}$ , 1:1; 4 ч,  $18^\circ\text{C}$ ) — с другой.

Защищенные рибонуклеозиды (2а–г) (см. схему) получали с выходами 75–85% по предложенной нами ранее методике [3]. По данным ТСХ (системы В, Г),  $3'$ -О-изомер и  $2',3'$ -О-диарилрибонуклеозид в продуктах синтеза практически не содержатся. Данные спектров  $^1\text{H-NMR}$  продуктов (2а–г) представлены в табл. 1.



Base=Ura (а),  $\text{ipa}^{\text{A}}\text{Ade}$  (б),  $\text{ipa}^{\text{A}}\text{Gyt}$  (в),  $\text{ipa}^{\text{A}}\text{Gua}$  (г). а) 2-хлорбензоилхлорид (1,1 экв.) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  — пиридине, 9:1,  $-78^\circ\text{C}$ . б)  $\text{PCl}_3$  (5 экв.), имидазол, N-метилморфолин в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-60^\circ\text{C}$ . в) 1,0 М триэтиламмонийбикарбонат, pH 8,5 (TEAB). д) салицилхлорфосфит (1,5 экв.)



Подвижность  $K_f$  и данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров ( $\delta$ , м.д.) N-изопроропоксиацетил-2'-O-(2-хлорбензоил)-5'-O-диметокситрипиррибонуклеозидов ( $\text{CDCl}_3$ , внутренний стандарт — TMS)

| Нуклеозид | $R_f$ (система) | $\text{H}^1$ д, 1H | $\text{H}^2'$ т, 1H | $\text{H}^3'$ т, 1H | $\text{H}^4'$ м, 1H | $\text{H}^5'$ д, 2H | $\text{OCH}_3$ с, 6H | $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}$ с, 2H | $\text{O}-\text{CH}_2$ м, 1H | $-\text{CH}_3$ д, 6H | Аром. м. 17H             | NH с, 1H                      | Другие протоны                       |
|-----------|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--|------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| (2а)      | 0,52 (В)        | 6,18               | 5,57                | 4,61                | 4,16                | 3,52                | 3,76                 |  |                              |                      | 6,71; 7,88;<br>7,42—7,42 | 8,86                          | H5: 5,32 (д, 1H)<br>H6: 7,30 (д, 1H) |
| (2б)      | 0,40 (В)        | 6,33               | 6,04                | 4,93                | 4,30                | 3,48                | 3,72                 | 4,15                                   | 3,32—3,53                    | 1,29                 | 6,72; 7,77;<br>7,40—7,87 | 9,43                          | H2: 8,40<br>H8: 8,63                 |
| (2в)      | 0,48 (В)        | 6,26               | 5,56                | 4,63                | 4,20                | 3,55                | 3,74                 | 3,96                                   | 3,50—3,70                    | 1,20                 | 6,77; 7,83;<br>7,05—7,35 | 8,89                          | H5: 5,56 (д, 1H)<br>H6: 8,22 (д, 1H) |
| (2г)      | 0,55 (Г)        | 6,15               | 5,85                | 4,76                | 4,20                | 3,42                | 3,68                 | 3,99                                   | 3,63—3,63                    | 1,19                 | 6,69; 7,71;<br>7,06—7,35 | 8,79<br>(NHCO); 11,69<br>(NH) | H8: 7,76                             |

Примечание. с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет, КССВ:  $J_{1'}$ ,  $y'$  =  $J_{2'}$ ,  $y'$  =  $J_{3'}$ ,  $y'$  =  $J_{4'}$ ,  $y'$  = 5 Гц; для (2а) и (2в)  $J_{5'}$ ,  $\delta$  = 8 Гц.

Таблица 2

$^3\text{P}$ -ЯМР-спектры рибонуклеозид-Н-фосфонатов (3а — г)

| Соединение | $\delta$ , м.д. | $^3\text{P}-\text{H}$ , Гц | $^3\text{P}-\text{H}$ , Гц |
|------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| (3а)       | $\pm 1,3$       | 617                        | 10,0                       |
| (3б)       | $\pm 1,3$       | 616                        | 10,0                       |
| (3в)       | $\pm 1,1$       | 617                        | 10,0                       |
| (3г) *     | $\pm 2,6$       | 627                        | 9,9                        |

\* Спектр снят в  $\text{CDCl}_3$ .

Таблица 3

Условия синтеза олигорибонуклеотидов

| Олигонуклеотид       | Твердофазный носитель |                   |                         | Выходы  |                                      |
|----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|
|                      | спейсер               | загрузка, ммоль/г | первый нуклеотид, ммоль | средний на стадию по поглощению $\text{DMTr}^+$ , % | после хроматографии на DEAE-сфазе, % |
| $\text{U}_6$         | 1                     | 16                | 2,4                     | 98  | 50                                   |
| $\text{A}_6$         | 4                     | 63                | 7,6                     | 93  | 14                                   |
| $\text{C}_6$         | 2                     | 42                | 5,5                     | 96  | 22                                   |
| $\text{A}_8\text{U}$ | 1                     | 16                | 2,4                     | 97  | 12                                   |
| AUGAGG               | 1                     | 66                | 11                      | 94  | 14                                   |
| AAUGAGG              | 2                     | 35                | 5,3                     | 96  | 15                                   |
| UCUACCCA             | 2                     | 31                | 4,5                     | 97  | 13                                   |

Рибонуклеозид-Н-фосфонаты (За-г) получали двумя способами. Из N,2',5'-защищенных рибонуклеозидов (путь А) как описано в работе [3] с внесенными небольшими изменениями: триазол заменили на имидазол и температуру реакции снизили до  $-60^{\circ}\text{C}$ , что, как показали наши исследования, позволяет избежать характерной модификации гуанозина ( $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр модифицированного 2'-О-бензоил-5'-О-диметокситритил-N<sup>2</sup>-изобутирилгуанозина:  $\delta$  6,1,  $J$  24 Гц).

Предлагаемый нами новый метод (путь Б) основан на селективной защите 2'-ОН с последующим фосфорилированием 3'-ОН салицилхлорфосфитом без выделения промежуточного N,2',5'-защищенного рибонуклеозида. Такой подход позволяет упростить синтез Н-фосфонатов, снизить трудовые и материальные затраты. Данные спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (За-г) представлены в табл. 2.

Синтез олигорибонуклеотидов проводили как описано в работе [3], используя в качестве конденсирующего агента хлорангидрид адамантанкарбоновой кислоты; носителем служил аминпропилированный Силохром С-80, якорные группы которого удлиняли глицином или 6-аминокапроновой кислотой (см. «Экспериментальную часть»). В проведенных нами экспериментах в большинстве случаев эффективнее оказались носители с спейсером на основе 6-аминокапроновой кислоты. Снятие олигорибонуклеотида с твердофазного носителя и удаление защитных групп осуществляли обработкой концентрированным водным раствором аммиака при  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 4 ч (этого достаточно для полного удаления всех защитных групп и не вызывает деградацию олигорибонуклеотида).

Олигорибонуклеотиды выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе А-25, анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2) и электрофорезом в ПААГ. Нуклеотидная последовательность и однозначность структуры олигорибонуклеотида AUGAGG подтверждены секвенированием (рис. 16). Эффективность предлагаемого метода показана на примере синтеза коротких олигорибонуклеотидов (табл. 3), полученных с хорошими выходами и достаточной степенью чистоты.

Функциональная активность синтезированного обоими методами гексануклеотида AUGAGG определялась по матричной способности образования комплекса инициации биосинтеза белка *in vitro*. Эксперименты выполнены по классической методике в высокоэффективной системе с использованием суммарного препарата тРНК (рис. 3а) или индивидуальной (рис. 3б) fMet-тРНК<sup>Met</sup> [13]. Функциональная активность гексамера AUGAGG, синтезированного новым методом (метод Б), сравнима со стандартным триплетом AUG, в то же время у препарата, синтезированного методом А, активность значительно ниже (рис. 3).

Таким образом, в данной работе предложено решение двух основных проблем применения 2'-О-ароильных защит в химическом синтезе олигорибонуклеотидов. Применение комбинации N-изопропоксиацетильной и 2'-О-(2-хлорбензоильной) групп решает проблему удаления защитных групп в щелочных условиях без деградации и модификации олигорибонуклеотидов и предложенный новый способ получения рибонуклеозид-Н-фосфонатов в свою очередь практически исключает возможность 2'  $\rightarrow$  3'-миграции ароильных групп, поскольку промежуточные N,2',5'-защищенные нуклеозиды не выделяются. По нашему мнению, представляется перспективной дальнейшая работа по повышению эффективности данного подхода с целью внедрения его для автоматического синтеза более длинных олигорибонуклеотидов.



## Экспериментальная часть

В работе использовали рибонуклеозиды (Биолар, Латвия), 1-метилимидазол, дидецилгексилкарбодимид (Merck, ФРГ), дихлоруксусную кислоту, 2-хлорбензойную кислоту (Fluka, Швейцария), DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), имидазол (Reanal, Венгрия), аминопропилированный Силохром С-80 (Биолар, Латвия), а также полученные известными способами ангидрид изопропоксиуксусной кислоты [9], салицилхлорфосфит [10], рибонуклеозид-3'-О-сукцинаты [11], N-Вос-глицин и 6-N-Вос-аминокапроновую кислоту [12]. Хлорангидриды адамантанкарбоновой и 2-хлорбензойной кислот получали обработкой соответствующих кислот тионилхлоридом в бензоле и очищали перегонкой в вакууме.

Для ТСХ использовали пластинки Силуфол UV-254 (Lachema, Чехо-Словакия) и системы хлороформ — метанол, 4:1 (А), хлороформ — метанол, 9:1 (Б), толуол — этилацетат, 1:1 (В), хлороформ — этилацетат, 3:7 (Г). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (Lachema, Чехо-Словакия).

Спектрофотометрические измерения проводили на приборах СФ-26 и СФ-4А (СССР) при контроле синтеза по диметокситритилкатиону при 510 нм, при определении выходов олигорибонуклеотидов при 250 нм. Спектры ЯМР сняты на приборе WH-90/DS (Bruker, ФРГ):  $^{31}\text{P}$ -ЯМР на частоте 36,44 МГц в смеси пиридин- $d_5$  —  $\text{CDCl}_3$ , 3:1, относительно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  как внешнего стандарта;  $^1\text{H}$ -ЯМР на частоте 90 МГц в  $\text{CDCl}_3$  при 30° С относительно тетраметилсилана как внутреннего стандарта.

Связывание  $^{35}\text{S}$ -меченой  $\text{fMet-tRNA}_i^{\text{Met}}$  проводили по методике работы [13] с использованием миллипоровых фильтров HUF5 (Synpor). Инкубация 10 мин при 37° С. Реакционная смесь содержала в 50 мкл буфера (50 мМ трис-НСl, 100 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ GTP, 1 мМ дитиотреит, рН 7,8) 60 пмоль 70S рибосом (Биолар, Латвия); насыщающие количества индивидуальных факторов инициации  $\text{IF}_1$ ,  $\text{IF}_2$ ,  $\text{IF}_3$ ; 62,5 мкг суммарной  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_i^{\text{Met}}$  (рис. 3а) или 60 пмоль индивидуальной  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_i^{\text{Met}}$  [13] (рис. 3б). В качестве матриц использовали триплеклеотид AUG (Boehringer) и синтетические гексануклеотиды AUGAGG.

*Общая методика получения N-изопропоксиацетилрибонуклеозидов.* Рибонуклеозид (0,035 моль) упаривали с пиридином (3×100 мл). Остаток суспендировали в 100 мл пиридина, добавляли 22 мл (19,2 г, 0,16 моль) триметилхлорсилана и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Смесь охлаждали до 0° С и прибавляли 11,6 г (0,053 моль) изопропоксиацетангидрида. Перемешивали при комнатной температуре 2 ч, отфильтровывали выпавший осадок, добавляли 0,5 мл воды и упаривали реакционную смесь до объема 50 мл. К остатку добавляли 50 мл диоксана, 30 мл воды и выдерживали 2 ч (в случае аденозина 12 ч) при комнатной температуре. Упаривали несколько раз, добавляя диоксан и толуол; остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонок 60×200 мм), элюируя линейным градиентом метанола (0—30%) в хлороформе. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, упаривали и сушили в вакууме. Выходы 70—80%.  $R_f$  0,70—0,80 (А), 0,20—0,30 (Б).

*Общая методика получения рибонуклеозид-N-фосфонатов (3а—г).* Путь А. Имидазол (5,58 г, 82 ммоль) суспендировали в 200 мл метиленхлорида. К суспензии добавляли 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 комнатной температуре. Охлаждали до -60° С и в течение 10 мин прибавляли 5 ммоль тщательно высушенного в вакууме N,2',5'-O-защитенного рибонуклеозида (2а—г) в 100 мл метиленхлорида. Смесь перемешивали 30 мин

при  $-60^{\circ}\text{C}$  и выливали в 300 мл 1,0 М ТЕАВ, рН 8,5, встряхивали, органический слой отделяли, сушили безводным  $\text{MgSO}_4$ , упаривали и очищали хроматографией на силикагеле (колонка  $40 \times 150$  мм), элюируя линейным градиентом метанола (0–10%) в хлороформе, содержащем 1% триэтиламина. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, упаривали несколько раз с добавлением сухого ацетонитрила и сушили в вакууме. Выход 60–70%,  $R_f$  0,30–0,40 (Б).

*Путь Б.* N,5'-О-Защищенный рибонуклеозид (1а–г) (7 ммоль) упаривали с пиридином ( $3 \times 80$  мл), растворяли в 90 мл метиленхлорида, добавляли 10 мл пиридина и охлаждали до  $-78^{\circ}\text{C}$  (ацетон – сухой лед). В течение 30 мин прибавляли 1,3 мл (8 ммоль) 2-хлорбензоилхлорида в 10 мл метиленхлорида и перемешивали 30 мин при  $-78^{\circ}\text{C}$ , затем прибавляли 1,35 мл (10 ммоль) салицилхлорфосфита в 10 мл метиленхлорида и в течение 1 ч оставляли нагреваться до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Смесь выливали в 300 мл 1,0 М ТЕАВ и фосфанат выделяли как описано выше (путь А). Выход 50–60%.

*Общая методика получения твердофазных носителей.* Силохром С-80 с якорными аминпропильными группами (4 г), дидиклогексилкарбодиимид (2,18 г, 12 ммоль) и 10 ммоль N-защитенной аминокислоты – 2,32 г N-Вос-диглицин (спейсер 1) или 2,29 г 6-N-Вос-аминокапроновой кислоты (спейсер 2) в 30 мл пиридина выдерживали при комнатной температуре 24 ч, периодически встряхивая. Носитель отфильтровывали и промывали пиридином ( $3 \times 5$  мл), этилацетатом ( $3 \times 5$  мл), метиленхлоридом ( $3 \times 5$  мл) и выдерживали 15 мин в смеси трифторуксусной кислоты – метиленхлорида, 1:1 (20 мл). Носитель промывали метиленхлоридом ( $3 \times 5$  мл), пиридином ( $3 \times 5$  мл), этилацетатом ( $3 \times 5$  мл) и ацетоном ( $3 \times 5$  мл) и сушили в вакууме. Всю операцию присоединения спейсера повторяли еще раз. Получали два типа носителей: спейсер 1 – тетраглицин (длина 20 атомов) и спейсер 2 – два остатка 6-аминокапроновой кислоты (длина 22 атома).

Носитель (3 г), рибонуклеозид-3'-О-сукцинат (1 ммоль), дидиклогексилкарбодиимид (0,55 г, 3 ммоль, или 0,2 г, 1,1 ммоль, для уридина и гуанозина) в 20 мл пиридина выдерживали при комнатной температуре, периодически встряхивали 24 ч. Носитель отфильтровывали, промывали пиридином ( $3 \times 5$  мл), кепировали смесью ангидрид изопропоксиуксусной кислоты – пиридин (1:20), 30 мин промывали пиридином ( $3 \times 5$  мл), этилацетатом ( $3 \times 5$  мл), этанолом ( $2 \times 5$  мл), ацетоном ( $3 \times 5$  мл) и сушили в вакууме. Синтез олигорибонуклеотидов проводили как описание в работе [3].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рознерс Э., Рекис А., Биздена Э. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 107–111.
2. Рознерс Э., Кумпиньш В., Рекис А., Биздена Э. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1580–1582.
3. Рознерс Э., Рекис А., Кумпиньш В., Биздена Э. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1531–1536.
4. Kempe T., Chow F., Sundquist W. I., Nardi T. J., Paulson B., Peterson S. M. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 21. P. 6695–6714.
5. Chaix C., Duplax A. M., Molko D., Teoule R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 18. P. 7381–7393.
6. Chaix C., Molko D., Teoule R. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 1. P. 71–74.
7. Schulhof J. C., Molko D., Teoule R. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 2. P. 397–416.
8. Wu T., Ogilvie K. K., Pon R. T. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 9. P. 3501–3517.
9. Uzanski B., Grajkowski A., Wilk A. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4863–4871.
10. Anschutz R., Emery W. O. // J. Liebigs Ann. Chem. 1987. B. 239. № 3. S. 301–313.
11. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach/Ed. Gait M. J. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 45–49.



12. Позднее В. П. // Химия природн. соедин. 1974. № 6. С. 164-167.

13. Берзиньш В. М., Янсонс И. В., Ренхоф Р. Ф., Циеленс И. Э. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. № 2. С. 470-473.

Поступила в редакцию  
27.II.1991

После доработки  
31.V.1991

E. ROZNEERS, R. RENHOF, I. CIELENS\*, V. KUMPINS\*, E. BIZDENA

**SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE H-PHOSPHONATE  
APPROACH USING BASE-LABILE 2'-O-PROTECTING GROUPS.**

**IV. A NEW APPROACH TO SOLVE THE PROBLEM OF MODIFICATION  
AND DEGRADATION OF OLIGORIBONUCLEOTIDES**

*Riga Technical University;*

*\* Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of Latvia, Riga*

An efficient method for the oligoribonucleotide synthesis using N-isopropoxyacetyl-2'-O-(2-chlorobenzoyl)-5'-O-dimethoxytritylnucleoside-3'-O-(H-phosphonates) as synthons has been developed. A new method of the one-step synthesis of the protected nucleoside-H-phosphonates is suggested. The use of the N- and 2'-protecting groups removable in mild basic conditions (conc.  $\text{NH}_3$ , 18-20°C) prevents degradation and modification of the oligoribonucleotides in course of the last step of the deprotection.