



ЛИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.057

СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ ЧЕРЕЗ РИБОНУКЛЕОЗИД-Н-ФОСФОНАТЫ

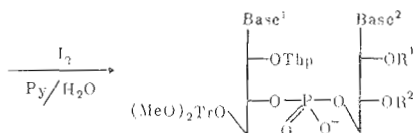
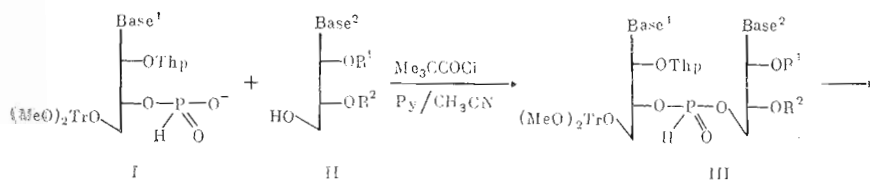
Венъяминова А. Г., Левина А. С., Косолапова З. А.,
Ренкова М. Н.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Синтетические олигорибонуклеотиды находят все более широкое применение в различных областях биоорганической химии и молекулярной биологии. Возрастающие потребности в таких соединениях могут быть удовлетворены лишь при резком повышении эффективности их синтеза. Наиболее перспективным в этом плане представляется Н-фосфонатный метод, описанный в 1986 г. [1, 2]; с использованием дезоксирибонуклеозид-Н-фосфонатов и пивалоилхлорида как конденсирующего агента в автоматическом режиме был синтезирован ряд олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 107 оснований. По данным [1, 2], Н-фосфонатный метод по эффективности не уступает широко используемому в настоящее время фосфитамидному методу синтеза олигонуклеотидов.

Учитывая простоту и экономичность Н-фосфонатного метода, мы решили проверить возможность его использования для синтеза олигорибонуклеотидов. Синтез не описанных в литературе 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил-*N*-ацилрибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов (I, Base-Ura; bz⁴Cyt; ib²Gua; bz⁶Ade) вели по аналогии с методом [2]. Полученные с выходом 85–90% рибонуклеозид-3'-Н-фосфонаты имели характерные ³¹P-ЯМР-спектры [2].

Для проверки принципиальной возможности использования полученных синтонов в олигорибонуклеотидном синтезе синтезировали два динуклеозидфосфата — СрС и GrA. Ход реакций контролировали с помощью ³¹P-ЯМР-спектроскопии.



а) Base¹ = Base² = bz⁴Cyt; R¹ = R² = Bz

б) Base¹ = ib²Gua, Base² = bz⁶Ade

R¹, R² = >CHOEt

Сокращения: ib — изобутирил, Thp — тетрагидропиранил, Melm — метилмидазол.

Цикл автоматического синтеза

Операция	Реагент, растворитель	Объем, мкл	Время, с *
Промывка	CH_2Cl_2		30
Деблокирование	1% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2		120
Промывка	CH_2Cl_2		70
Дозирование мономера	$\text{Pu} - \text{CH}_3\text{CN}$ (1:1)	210	60
Дозирование нивалоилхлорида	0,05 М (I) в $\text{Pu} - \text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) 0,25 М нивалоилхлорид в $\text{Pu} - \text{CH}_3\text{CN}$ (1:1)	150	
Конденсация			90
Промывка	$\text{Pu} - \text{CH}_3\text{CN}$ (1:1)		20

* Скорость протекания через реактор 2 мл/мин.

При добавлении 5 экв. нивалоилхлорида к эквимольной смеси нуклеозид-3'-Н-фосфоната (I) и 5'-ОН-компонента в $\text{Pu} - \text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) в спектре ^{31}P -ЯМР через 1,5 мин полностью исчезал сигнал исходного соединения (Ia) ($\delta = +0,69$ м.д.) и появлялись два сигнала ($\delta = +9,35$ и $+8,8$ м.д.) диастереомеров динуклеозид-Н-фосфоната (IIIa). Последний после обработки реакционной смеси 0,2 М I_2 в смеси $\text{Pu} - \text{H}_2\text{O}$ (50:1) превращался в динуклеозидфосфат (IVa) ($\delta = -0,55$ м.д.). Характер изменения химических сдвигов и структура сигналов в нашем случае согласовывались с литературными данными [1].

Пригодность полученных синтонов (I) для твердофазного синтеза олигорибонуклеотидов была показана на примере синтеза пентануклеозидтетрафосфата $(\text{Ur})_4\text{U}$ в колонке с пористым фильтром и гексануклеозидпентафосфата $(\text{Ur})_5\text{C}$ в автоматическом режиме на синтезаторе «Виктория-4М» (СКТВ СЭ и АП СО АН СССР, МГУ НИБХ СО АН СССР).

В качестве полимерного носителя использовали силикагель марки «Силохром С-120» [3]. Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена проводили согласно методикам [3, 4]. Для синтеза использовали 50 мг полимера с емкостью по присоединенному нуклеозиду 90 мкмоль/г. Цикл присоединения одного нуклеотидного звена проводили согласно карте-схеме операций, представленной в таблице. Время одного цикла 6,5 мин. Средний выход на стадии, определенный спектрофотометрически по образованию $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -катиона, 88–90%.

После проведения необходимого числа циклов связанный с полимером олигорибонуклеозид-Н-фосфонат окисляли до соответствующего фосфата. Для окисления использовали реакцию Тодда – Атертона [5], а именно обработку смесью $\text{Pu} - \text{H}_2\text{O} - \text{CCl}_4 - \text{Et}_3\text{N}$, 30:8:8:1 (5 мин). После удаления с полимера и гидролиза защитных групп стандартными методами олигонуклеотиды выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией в ранее описанных условиях [6]. Было показано, что как окисление по реакции Тодда – Атертона, так и окисление водным раствором I_2 , т. е. последовательная обработка 0,1 М I_2 в смеси $\text{Pu} - \text{MeIm} - \text{H}_2\text{O} - \text{THF}$, 5:1:5:90 (2,5 мин) и 0,1 М I_2 в $\text{Et}_3\text{N} - \text{H}_2\text{O} - \text{THF}$, 5:5:90 (2,5 мин) [2] приводят к реакционным смесям практически одинакового состава.

Строение олигонуклеотидов $(\text{Ur})_4\text{U}$ и $(\text{Ur})_5\text{C}$, выделенных в количестве 6–10 OE_{260} , было доказано с помощью гидролиза пиримидил-РНКазой и смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры соответственно с последующим анализом ВЭЖХ [7].

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о несомненной перспективности Н-фосфонатного метода для олигорибонуклеотидного синтеза. Этот метод обладает целым рядом достоинств, что отмечалось уже ранее в работах по синтезу дезоксирибоолигонуклеотидов [1, 2]: простой способ получения мономерных синтонов и их устойчивость, доступный конденсирующий реагент, высокая скорость реакции конденсации, малый расход реагентов и, наконец, значительное уменьшение числа стадий, приводящих к целевому олигонуклеотиду. В настоящее время продол-

жается работа над оптимизацией условий этого синтеза на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М».

Авторы благодарят Н. И. Комарову за проведение ВЭЖХ-анализов и выражают глубокую признательность В. Ф. Зарытовой и сотрудникам лаборатории за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Froehler B. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469–472.
2. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5399–5407.
3. Ломакин А. Ш., Ястребов С. Ш., Попов С. Г. // *Биоорганич. химия.* 1985. Т. 11. № 7. С. 920–926.
4. Ефимов В. А., Буракова А. А., Резердатто С. В., Чахмачева О. Г. // *Биоорганич. химия.* 1983. Т. 9. № 10. С. 1367–1381.
5. Atherton F. R., Openshaw H. T., Todd A. R. // *J. Chem. Soc.* 1945. № 10. P. 660–663.
6. Веньямина А. Г., Косолапова З. А., Левина А. С. // *Биоорганич. химия.* 1987. Т. 13. № 1. С. 125–127.
7. Baran G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvancu Yu. A., Kuzmin C. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 264. № 1. P. 69–90.

Поступило в редакцию
16.II.1987

SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES VIA RIBONUCLEOSIDE-H-PHOSPHONATES

VENIJAMINOVA A. G., LEVINA A. S., KOSOLAPOVA Z. A.,
РЕРКОВА М. Н.

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

The synthesis of oligoribonucleotides via 5'-O-dimethoxytrityl-2'-E-tetrahydropyranyl-N-acylribonucleoside 3'-H-phosphonates is described. With these synthones and pivaloyl chloride as condensing agent, the synthesis of CpC and GpA in solution and the polymer support synthesis of (Up)₄U and (Up)₅C in manual variant and at the automatic synthesizer «Victoria-4M» was performed. The obtained oligonucleotide-H-phosphonates were oxidized to phosphates both with usually employed aqueous iodine solution and with of CCl₄ – Et₃N – H₂O (the Todd – Atherton reaction).