



УДК 547.963.32.07:577.113.4

Н-ФОСФОНАТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ

© 1998 г. М. Н. Репкова, Т. М. Иванова, М. И. Мещанинова*, А. Г. Веньямина#

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8;

*Новосибирский государственный университет

Поступило в редакцию 29.12.97 г. Принято к печати 04.02.98 г.

Предложен вариант твердофазного *N*-фосфонатного синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих атом брома или алифатический аминоклипер в С-5- или С-8- положениях уридина или аденозина.

Ключевые слова: олигорибонуклеотиды модифицированные, синтез, *N*-фосфонатный метод, нуклеиновые основания, модификация.

Олигорибонуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеотиды в определенных позициях олигонуклеотидной цепи, используются как прецизионные инструменты исследования процессов, основанных на РНК-НК- и РНК-белковых взаимодействиях. Удобный вариант модификации олигонуклеотидов – модификация гетероциклических оснований [1, 2]. Наиболее общим подходом к введению таким образом модифицированных нуклеотидов в РНК являются твердофазные химические методы, так как при этом возможно регламентирование количества введенных модифицированных нуклеотидов, их типа и положения в цепи. В основном для этих целей используют фосфитамидный метод [3]. Учитывая простоту и экономичность синтетического цикла *N*-фосфонатного метода, мы использовали этот подход для синтеза различных типов модифицированных по гетероциклическому основанию олигорибонуклеотидов.

Новые представители класса рибонуклеозид-3'-*N*-фосфонатов (Ia)–(Iv) были получены нами из соответствующих Br-замещенных нуклеозидов по приведенной схеме. Структура промежуточных и конечных продуктов при этом была подтверждена элементным анализом и данными УФ-, ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектров.

Синтез модифицированных олигорибонуклеотидов, содержащих атом брома в С-5- или С-8-положениях нуклеозида, проводили в колонке с пористым фильтром в масштабе 2–5 мкмоль полимерсвязанного первого нуклеозида, используя в качестве мономерных синтонов наряду с обыч-

ными мономерными синтонами модифицированные нуклеозид-3'-*N*-фосфонаты (Ia)–(Iv). После стандартного детритилирования конденсацию в каждом цикле наращивания олигонуклеотидной цепи осуществляли, используя равные объемы 0.05 М нуклеозид-*N*-фосфоната (5 экв.) и 0.25 М пивалоилхлорида (25 экв.) в смеси пиридин–ацетонитрил (1:1) с последующей промывкой полимера абс. ацетонитрилом. Время конденсации 2 мин. Каждая конденсация повторялась дважды. Окисление, удаление с полимера и деблокирование олигонуклеотидов проводили как описано в работе [4]. Критической стадией в данном случае является обработка конц. NH₄OH. На модельных нуклеозидах было показано, что в то время как в случае 8-BrAdo и 8-BrGuo в стандартных условиях (конц. NH₄OH, 16 ч, 55°C) не замечено образования NH₂-содержащих нуклеозидов, 5-BrUrd, по данным обращенно-фазовой МКХ, превращается приблизительно на 7% в 5-NH₂Urd [5]. Поэтому гексануклеотид U^{Br}U₅ удаляли с полимера обработкой конц. NH₄OH в течение 1 ч при 25°C. Выделение олигорибонуклеотидов с помощью ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ (таблица) с последующим осаждением в виде литиевых солей проводили так, как описано в работе [4].

Br-содержащие аналоги РНК могут выполнять самостоятельную роль при изучении РНК-белковых взаимодействий, рентгеноструктурном анализе и др. [6], а также служить предшественниками для синтеза олигорибонуклеотидов с алифатическими аминоклиперами, введенными в гетероциклические основания. Этот подход был продемонстрирован нами на примере синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих этилендиаминовые клиперы в С-5- или С-8-положениях уридина или аденозина. После выполнения необходимого числа циклов *N*-фосфонатного синтеза

Автор для переписки (тел.: (383-2) 39-62-75; факс: (383-2) 35-16-55; e-mail: ven@niboch.nsc.ru).

Выходы и характеристики модифицированных олигорибонуклеотидов (L = -NHCH₂CH₂)

Олигорибонуклеотид	Выход*, %	Обращенно-фазовая МКХ ^{2*}					Нуклеотидный состав ^{2*}
		Время удерживания, мин	Спектральные соотношения				
			250/260	270/260	280/260	290/260	
U ^{Br} pUpUpUpUpU	13 (66)	9.3	0.74	0.90	0.52	0.20	U ^{Br} : pU = 1.0 : 4.9 ^{3*}
U ^{LNH₂} pUpUpUpUpU	8 (60)	10.4	0.83	0.83	0.43	0.16	U ^{LNH₂} : pU = 1.0 : 5.4 ^{3*}
A ^{Br} pUpGpUpUpU	7 (59)	12.3	0.79	0.87	0.49	0.15	A ^{Br} : pU : pG = 1.3 : 4.4 : 1.0 ^{3*} A ^{Br} : U : G = 1.1 : 4.0 : 1.0 ^{4*}
A ^{LNH₂} pUpGpUpUpU	6 (57)	11.4	0.78	0.92	0.61	0.24	A ^{LNH₂} : pU : pG = 0.9 : 4.2 : 1.0 ^{3*}
ApUpG ^{Br} pUpUpU	17 (70)	9.2	0.77	0.84	0.43	0.15	A : pU : pG ^{Br} = 1.0 : 4.0 : 1.0 ^{3*}

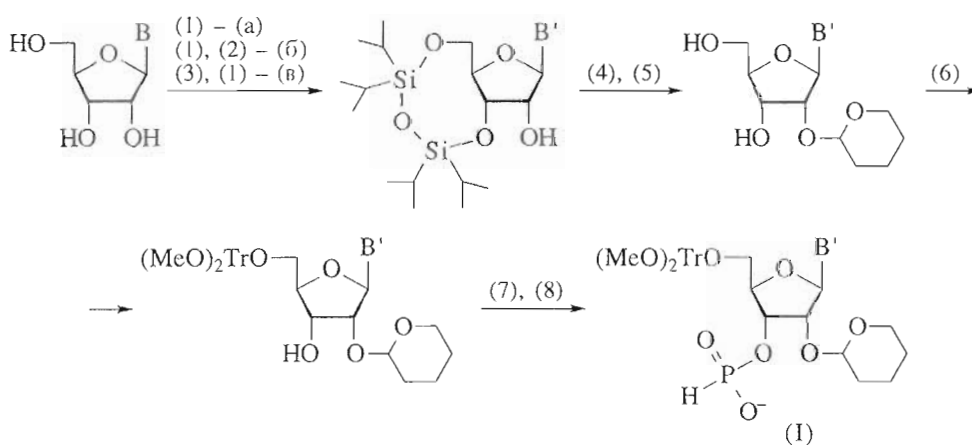
* Приведен общий выход (выход на стадию) после двух хроматографий.

2* Nucleosil C-18 (5 мкм, Macherey-Nagel, Германия), градиент концентрации CH₃CN (0–25 %) в 0.05 M LiClO₄.3* Нуклеаза P₁ в 30 mM NaOAc (pH 5.2), 1 mM ZnSO₄ (4 ч, 37°C).4* Нуклеаза P₁ + щелочная фосфатаза *E. coli*, тот же буфер + 1–2 мкл 1% NaOH до pH 8.5 (4 ч, 37°C).

и окисления [4] полимерсвязанные Bг-содержащие олигорибонуклеотиды выдерживали в 200 мкл смеси этилендиамин–этанол (1 : 1) 2 ч при 37°C для 5-BrUrd-содержащих олигорибонуклеотидов и 2 ч при 56°C для 8-BrAdo-содержащих олигомеров с последующей обработкой конц. NH₄OH (16 ч, 55°C). Затем раствор декантировали, упаривали досуха, растворяли в воде, доводя 0.2 н. HCl pH раствора до 7.0, и обессоливали на Sep-Pak C18 Cartridge (Millipore, США), промывая сначала водой, затем 50% водным ацетонитрилом. После удаления 2'-O-тетрагидропиранильных групп (pH 2, 50°C, 2 ч) модифицированные олигорибо-

нуклеотиды выделяли хроматографически (таблица). Условия обработки этилендиамином были подобраны на основании результатов превращения 5-BrUrd и 8-BrAdo с последующим анализом реакционных смесей обращенно-фазовой МКХ. При определении нуклеотидного состава модифицированных олигорибонуклеотидов (таблица) были использованы значения молярных коэффициентов поглощения специально синтезированных модифицированных нуклеозидов-маркеров.

Наличие в синтезированных модифицированных олигонуклеотидах алифатической аминогруппы высокой нуклеофильности в гетероцикли-



B = 5-BrUra (a); 8-BrAde (б); 8-BrGua (в)

B' = 5-BrUra (a); N⁶-bz-8-BrAde (б); N²-ibu-8-BrGua (в),

ibu - изобутирил

1) (iPr)₂(Cl)SiOSi(Cl)(iPr)₂; 2) BzCl; 3) iPrCOCl; 4) 3,4-дигидро-2H-пиран, H⁺;5) (C₂H₅)₄NBt/KF; 6) диметокситриэтилхлорид; 7) салицилхлорфосфит; 8) H₂O

Схема

ческом основании и свободных 5'- и 3'-концевых гидроксильных групп позволяет конструировать на их основе различного типа реагенты для сайт-специфической модификации биополимеров.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (грант № 96-04-50189) и межвузовской научно-технической программы "Химия" (подпрограмма "Биохимические технологии").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sanghvi Y.S.* // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crooke, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1993. P. 273–288.
2. *Manoharan M.* // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crooke, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1993. P. 303–349.
3. *Beaucage S.L., Radhakrishnan P.I.* // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 1925–1963.
4. *Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
5. *Ferrer E., Fabrega C., Garsia R.G., Azorin F., Eritja R.* // Nucleosides Nucleotides. 1996. V. 15. P. 907–921.
6. *Usman N., Cedergren R.* // Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. P. 334–339.

The H-Phosphonate Synthesis of Oligoribonucleotides Containing Modified Bases

M. N. Repkova*, T. M. Ivanova*, M. I. Meshchaninova**, and A. G. Ven'yaminova*#

* *Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

** *Novosibirsk State University*

An alternative solid phase H-phosphonate synthesis of oligoribonucleotides bearing a bromine atom or an aliphatic amino linker at position C-5 of uridine or C-8 of adenosine was proposed.

Key words: modified oligoribonucleotides, synthesis, H-phosphonate approach, nucleic bases, modification

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 39-6275; fax: +7 (383-2) 35-1655; e-mail: ven@niboch.nsc.ru.