

ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ В ХИМИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

©2012 г. А. В. Аралов[#], О. Г. Чахмахчева

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад.
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 24.01.2012 г. Принята к печати 14.02.2012 г.

Представлены материалы, касающиеся химического синтеза олигорибонуклеотидов и применяемых при этом защитных групп. Подробно рассматриваются последние данные по способам блокирования 2'-ОН-функций производных нуклеотидов, представляющих собой мономеры для синтеза РНК.

Ключевые слова: олигорибонуклеотиды, химический синтез, защитные группы, 2'-гидроксильная функция.

Оглавление

1. Введение.
2. Защитные группы для 5'-гидроксильных групп, аминогрупп гетероциклических оснований и фосфатного остатка.
3. Блокировка 2'-гидроксильных функций:
 - группы с эфирным типом связи,
 - трет*-бутилдиметилсилильная (TBDMS) группа,
 - 2-(4-нитрофенил)этилсульфонильная (Nres) группа,
 - защитные группы ацетального типа.
 - ортоэфирные группы,
 - группы со сложноэфирным типом связи,
 - группы с ацетальэфирным типом связи,
 - тионокарбаматные группы,
 - азидосодержащие группы.
4. Заключение.

1. Введение

Природные и модифицированные олигонуклеотиды являются универсальными инструментами для решения широкого круга задач в молекулярной биологии, генетической инженерии и биотехнологии. В последние годы интерес многих исследовательских групп привлекают синтетические фрагменты РНК, в частности РНК-

Список сокращений: EDA – этилендиамин; DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундек-7-ен; DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; EEDQ – этил 1,2-дигидро-2-этокси-1-хинолинкарбоксилат; MeIm – 1-метилимидазол; NBS-Cl – 2-нитробензолсульфенилхлорид; NMP – 1-метилпирролидин-2-он; Pac – феноксиацетил; TBAF – фторид тетрабутиламмония; TfOH – трифторметансульфокислота; кРНК – короткая интерферирующая РНК; тРНК^{Ala} – аланиновая транспортная РНК; тРНК₂^{Gly} – глициновая транспортная РНК.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 336-42-00; эл. почта: Baruh238@mail.ru)

аптамеры [1], рибозимы [2], киРНК [3-5] и микроРНК [6], в связи с чем растет необходимость в разработке более эффективных методов синтеза этих соединений.

В автоматическом химическом синтезе РНК и ДНК для наращивания цепи используются нуклеотидные мономеры. Получение соответствующим образом защищенных нуклеотидов рибо-ряда представляет собой значительно более сложную задачу, чем в случае ДНК-мономеров, в связи с необходимостью защиты 2'-гидроксильной функции рибофуранозного кольца. Кроме того, наличие данной группы делает олигорибонуклеотиды более чувствительными к изменениям рН среды, что также осложняет их синтез. Поэтому выбор подходящих блокирующих групп для 2'-ОН-функции остатка рибозы является одной из ключевых задач для получения фрагментов РНК.

К 2'-*O*-защитным группам предъявляются три основных требования: они должны легко вводиться, быть устойчивыми в процессе всего синтеза олигонуклеотида и удаляться в условиях, при которых целевой олигонуклеотид полностью стабилен [7]. Кроме того, поскольку молекулы рибонуклеозидов и рибонуклеотидов хиральны, для облегчения очистки и идентификации получаемых продуктов предпочтительнее использовать защитные группы, не содержащие асимметрических атомов. Нежелательно также, чтобы 2'-*O*-защитная группа представляла собой объемную группировку, т.к. это приводит к увеличению времени реакции межнуклеотидной конденсации и снижению выходов продуктов на этой стадии. При деблокировании 2'-ОН-функции по возможности следует также избегать использования реагентов, которые осложняют выделение и очистку полностью деблокированных олигорибонуклеотидов.

Деблокирование олигонуклеотидов чаще всего проводится в кислых или основных условиях. После деблокирования 2'-гидроксильной группы, в основных условиях протекает его ионизация под действием гидроксид-иона, причем pK_a данной группы зависит от концентрации солей и типа гетероциклического основания содержащего его нуклеотидного звена [8, 9]. Образующаяся 2'-оксианионная группа вступает во внутримолекулярную реакцию с вицинальной 3'-*O*-фосфодиэфирной группой соединения (1), в результате которой образуется циклический фосфат (2) и высвобождается 5'-гидроксильная группа следующего нуклеозидного остатка (3) (схема 1). Из литературы известно, что данная реакция является реакцией первого порядка относительно концентрации 2'-оксианиона и увеличение значения рН на единицу в диапазоне от 9 до ~13 приводит к 10-кратному увеличению скорости расщепления межнуклеотидной связи [10]. Затем, получающееся промежуточное соединение (2) подвергается дальнейшему катализируемому основанием гидролизу, давая смесь изомерных 2'-*O*- и 3'-*O*-фосфатов (4) и (5), соответственно.

В кислых условиях, наряду с расщеплением, происходит также изомеризация межнуклеотидной связи [8]. Предполагают, что данный процесс протекает через образование промежуточного фосфоранового соединения (6) (схема 2). Далее, если происходит расщепление P-O2'-связи, то образуется исходное соединение (1), если же расщепляется P-O3'-связь, то образуется изомерный продукт (7). Наконец, при расщеплении P-O5'-связи образуется 2',3'-циклический фосфат (2), который, подвергаясь гидролизу, приводит к образованию смеси 2'- и 3'-фосфатов (4) и (5). Все это накладывает определенные ограничения при выборе подходящих защитных групп.

Методы синтеза олигорибонуклеотидов и используемые в них защитные группы были достаточно полно изложены в обзорах [11-14], однако за последние несколько лет появился ряд новых 2'-O-защитных групп, рассмотрению которых и посвящена основная часть данного обзора.

2. Защитные группы для 5'-гидроксильной функции, аминогрупп гетероциклических оснований и фосфатного остатка.

Следует отметить, что на выбор 2'-O-защитных групп в значительной степени влияет также подбор других защитных групп и реагентов. Так, 5'-гидроксильная функция чаще всего блокируется 4,4'-диметокситритильной (DMTr) (8a) [15], 4-монометокситритильной (MMTr) (8b) [15] и 9-фенилксантен-9-ильной (Px) (9a) [16] группами, которые быстро и количественно удаляются обработкой ди- или трихлоруксусной кислотой в безводном дихлорметане. Ясно, что в случае любой из этих групп необходимо использовать 2'-O-защитную группу, которая будет полностью стабильна в условиях, требуемых для удаления 5'-O-защитной группы. Были также предложены другие 5'-O-защитные группы, удаляемые в слабо основных или практически нейтральных условиях [17], в частности 9-флуоренилметоксикарбонильная (Fmoc) (10) [18], левулинильная (Lev) (11) [19], 2-(дибромметил)бензоильная (Dbmb) (12) [20] и 2-(изопропилтиометоксиметил)бензоильная (Ptmt) (13) [21] группы. Однако ни одна из этих групп не нашла широкого применения в твердофазном синтезе РНК, хотя некоторые из них оказались пригодными для синтеза олигорибонуклеотидов в растворе.

Формулы I

Для блокирования аминofункций остатков цитозина (14), аденина (15) и гуанина (16) наиболее часто используют защитные группы ацильного типа, тогда как остаток урацила (17), как правило, оставляют незащищенным [22]. Удаление N-ацильных групп с гетероциклов обычно осуществляют аммонолизом. Поскольку при аммонолизе в водной среде (pH > 12) в молекуле РНК происходит расщепление межнуклеотидных связей, деблокирование аминогрупп гетероциклических оснований проводят на стадии,

предшествующей стадии удаления 2'-*O*-защитной группы, которая должна быть стабильна в данных условиях.

Предложен также ряд других *N*-защитных групп, которые удаляются обработкой водным аммиаком или оксимат-ионами. Они включают диметилформамидиновую (Dmf) защитную группу для защиты остатков аденина (**18**, R = CH₃) и гуанина (**19**), и дибутилформамидиновую (Dbf) защитную группу для защиты остатков аденина (**18**, R = Bu) и цитозина (**20**), обе из которых удаляются водным аммонолизом [23, 24]. Кроме того, недавно предложено удалять Dmf- и Dbf-группы с прикрепленных к носителю 2'-*O*-защищенных или модифицированных олигорибонуклеотидов в кислых условиях обработкой трифлатом имидазолия (IMT) или 1-гидроксibenзотриазолом (HOBT) при 50°C в течение приблизительно 24 ч [25].

При синтезе олигорибонуклеотидов в растворе желательно защищать остаток гуанина одновременно по *O*⁶- и *N*²-атомам. Подходящими *O*⁶-защитными группами являются арильные группы (**21**) (Ar = 2-нитрофенил, 3-хлорфенил и 3,5-дихлорфенил) [21, 26, 27], которые легко удаляются обработкой *N*¹,*N*²,*N*³,*N*⁴-тетраметилгуанидиниевой солью (*E*)-2-нитробензальдоксима или (*E*)-пиридин-2-карбоксальдоксима (оксиматная обработка [28]) перед аммонолизом *N*-ацильных защитных групп, а также удаляемая аммонолизом *N,N*-дифенилкарбамоильная группа (**22**) [29].

Формулы II

Практически все группы, которые обычно используют для блокирования межнуклеотидных фосфорсодержащих остатков в твердофазном синтезе как ДНК-, так и РНК-фрагментов, удаляются в основных условиях. Наибольшее распространение в твердофазном синтезе амидофосфитным методом получила цианэтильная (CE) группа (**23**) [30], снимающаяся при обработке аммиаком одновременно с защитными группами гетероциклических оснований, а в синтезе олигорибонуклеотидов фосфотриэфирным методом в растворе – 2-хлорфенильная защитная группа (**24**) [31], которую удаляют обработкой сопряженным основанием (*E*)-пиридин-2-карбоксальдоксима или (*E*)-2-нитробензальдоксима [28, 32]. Хонда и др. [33] был разработан другой подход, который включал использование промежуточных *S*-арилфосфотиоатов (**25**), превращающихся в соответствующие фосфодиэфиры при обработке оксимат-ионами [29]. Ефимов и сотр. [34, 35] разработали быстрый фосфотриэфирный метод синтеза фрагментов РНК, в котором фосфатзащитная 4-метокси-1-оксидо-2-пиколильная группа (**26**) выполняет также каталитическую функцию и удаляется с синтезированных олигорибонуклеотидов, присоединенных к носителю, обработкой пиперидином или 1М йодидом лития в ацетонитриле.

3. Защитные группы для 2'-гидроксильных функций нуклеотидов.

Защитные группы для 2'-гидроксильных функций рибонуклеозидов, предложенные к настоящему моменту, приведены в табл. 1, 2 и 3, в которых они разделены на несколько групп по типам химической связи.

Группы с простым эфирным типом связи (табл.1) были предложены одними из первых, но не получили широкого применения из-за наличия ряда недостатков. В частности, в условиях деблокирования бензильной (Bn) группы может протекать частичное восстановление 5,6-двойной связи остатка урацила и, также, как и в случае 2-нитробензильной группы, существует опасность ее неполного удаления [37, 40]. Удаление 4-метоксибензильной группы сопровождается частичным расщеплением гликозидных связей [43], а использование объемной 1,1-дианизил-2,2,2-трихлорэтильной (DATE) группы приводит к увеличению времени и снижению выхода реакции межнуклеотидной конденсации [44]. Наиболее перспективными среди них можно считать цианэтильную (CE) [45] и аллильную (All) группы [46].

трет-Бутилдиметилсилильная (TBDMS) группа, предложенная первоначально для блокирования енольных группировок [47] и гидроксильных функций спиртов [48], была также использована Огилви и сотр. в качестве защитной для 2'-ОН-функции нуклеозидов [49]. В настоящее время 2'-*O*-TBDMS широко применяется в твердофазном синтезе олигорибонуклеотидов амидофосфитным методом [50], а также была опробована в *H*-фосфонатном способе синтеза [51]. Тем не менее, она удовлетворяет не всем необходимым требованиям и обладает некоторыми недостатками, например, способна мигрировать в основных условиях с 2'- на 3'-ОН-функцию нуклеозидов. Кроме того, создаваемые ею стерические препятствия приводят к снижению скорости и выхода реакции межнуклеотидной конденсации, поэтому предпочтительно использовать в качестве активатора в амидофосфитном методе синтеза более эффективный 5-этилтио-1*H*-тетразол [52]. В то же время важным преимуществом данной группы является ее стабильность в кислых условиях, требуемых для удаления 5'-*O*-DMTr-группы.

Следует отметить, что при деблокировании олигорибонуклеотидов, когда проводится обработка конц. водным раствором аммиака при 55°C [53], возможно частичное удаление 2'-*O*-TBDMS-группы и, как следствие, расщепление межнуклеотидных связей [54]. Данная проблема решается заменой стандартных защитных групп аминofункций гетероциклических оснований более лабильными группами ацильного типа [55], что позволяет использовать вместо конц. аммиака смесь 35% водного аммиака и этанола [56], безводный раствор аммиака в этаноле [57] или водный метиламин [58]. Чаикс и др. обнаружили, что при использовании для защиты остатков аденина и гуанина *Rac* группы (**15** и **16**, R = COCH₂OPh) и ацетильной группы –

для цитозина (**14**, R = Ac) их удаление в смеси водный аммиак/этанол (1:1, v/v) протекает полностью при комнатной температуре в течение 10-15 мин, что позволяет деблокировать остатки гетероциклических оснований и отщеплять олигонуклеотид с носителя, не затрагивая 2'-O-TBDMS-группы и избежать расщепления межнуклеотидных связей [55].

Для удаления TBDMS-группы обычно используется раствор TBAF в THF [50]. Однако из-за плохой растворимости олигонуклеотидов в THF возможно их неполное деблокирование, что осложняет выделение и очистку полученных синтетических фрагментов РНК [51]. Поиски новых реагентов привели к применению для этих целей Et₃N·3HF [59, 60], который используют как в чистом виде [56], так и в виде раствора в 1-метилпирролидоне в присутствии триэтиламина [58], а также KF и NH₄F в смеси DMSO - вода (~3:1) или диметилацетамид-вода (~1:1) для деблокирования коротких (<10 нт) и более длинных 2'-O-TBDMS-защищенных олигорибонуклеотидов, соответственно [61].

2-(4-Нитрофенил)этилсульфонильная (Npes) группа также была опробована в амидофосфитном методе синтеза олигорибонуклеотидов [62]. Однако при ее удалении с остатка уридина параллельно протекает реакция внутримолекулярного замещения с образованием 2,2'-ангидронуклеозида, причем скорость этой побочной реакции сравнима со скоростью реакции β-элиминирования. По этой причине Npes-группа не нашла применения в синтезе фрагментов РНК [63].

Защитные группы ацетального типа (табл. 2) обладают рядом преимуществ по сравнению с TBDMS. Во-первых, их, как правило, можно вводить региоселективно по 2'-ОН-функции, и после введения они не способны мигрировать. Во-вторых, они стабильны в основных условиях, которые требуются для деблокирования межнуклеотидных связей и остатков гетероциклов. В-третьих, 2'-O-защищенные РНК, полученные после удаления других защитных групп, можно подвергать очистке в нейтральных или основных условиях, не опасаясь расщепления эндонуклеазами [22]. Поскольку ацетальные группы удаляются в кислых условиях, для предотвращения расщепления и изомеризации межнуклеотидных связей эти условия должны быть достаточно мягкими [8, 64].

Было предложено достаточно много защитных групп ацетального типа для 2'-гидроксильной функции рибонуклеозидов, первой из них была тетрагидропиран-2-ильная (Thp) [65-67]. Ее недостатком является наличие асимметрического атома углерода, что при введении в хиральные нуклеозиды приводит к образованию смеси диастереомеров. Поиски ахиральной альтернативы Thp привели к ее 4-метокситетрагидропиран-4-ильному (Mthp) аналогу [68, 69], удаляемому в условиях, аналогичных условиям удаления Thp, но за более короткий промежуток времени [70].

Данная группа была использована для синтеза в растворе 3'-концевых фрагментов тРНК^{Ala} дрожжей [21,71-73]. Оцука и др. описали совместное использование тетрагидрофуран-2-ильной (Thf) и DMTr- (**8a**) групп для защиты 2'- и 5'-гидроксильных групп, соответственно, и синтезировали в растворе 33-звенную последовательность тРНК₂^{Gly} *E. coli* [74]. При этом для удаления 5'-концевой DMTr-группы использовался бромид цинка в смеси дихлорметан/изопропанол, чтобы избежать кислотного гидролиза Thf-группы, которая оказалась более лабильной, чем Thp-группа [75].

Вышеупомянутые группы не пригодны для использования в сочетании с кислотолабильными 5'-*O*-защитными группами, например DMTr (**8a**), P_x (**9a**) и 9-(4-метоксифенил)ксантен-9-ильной, для синтеза протяженных фрагментов РНК, т.к. деблокирование 5'-гидроксильной функции сопровождается частичным высвобождением 2'-гидроксильной группы, что приводит к снижению выхода целевого продукта в результате расщепления и изомеризации межнуклеотидных связей [76-78]. Использование же для блокировки 5'-ОН-функции устойчивого в кислых условиях левулинильного остатка неудобно, поскольку не позволяет оценивать эффективность прохождения реакции межнуклеотидной конденсации спектрофотометрически [79]. В свою очередь при применении 5'-*O*-Fмос-группы ее удаление обработкой DBU сопровождается частичным удалением цианэтильной *P*-защитной группы [80].

Риз и др. предложили ряд защитных групп, которые полностью протонированы в дихлорметане, содержащем 2-3% трихлоруксусной кислоты, но практически непротонированы в более мягких кислых условиях (рН 2 или 3.75), используемых на конечной стадии деблокирования олигорибонуклеотидов. Как результат, данные группы стабильны в сильнокислых условиях, требуемых для детритилирования, но удаляются в мягких условиях кислотного гидролиза на конечной стадии деблокирования. Среди них можно упомянуть 1-(2-хлор-4-метилфенил)-4-метоксиперидин-4-ильную (Ctmp) [81-83], а также 1-(2-фторфенил)-4-метоксиперидин-4-ильную (Ftmp) группу, которая более стабильна в сильнокислых условиях (рН 0.5-1.0), но медленнее удаляется при рН 3.75 по сравнению с Ctmp-группой [22, 64, 84-89]. Позднее была предложена 1-(4-хлорфенил)-4-этоксиперидин-4-ильная (Cper) группа [90, 91].

Другие попытки разработать стабильные на стадии детритилирования защитные группы ацетального типа, которые в то же время удалялись бы в достаточно мягких условиях, позволяющих избежать изомеризации и расщепления межнуклеотидных связей, привели к введению Сандстремом и сотр. 1,5-диметоксикарбонил-3-метоксипентан-3-ильной (Mdmp) группы [92]. Эта группа превращается при обработке водным аммиаком, используемой в твердофазном синтезе, в бисамид, который в семнадцать раз более чувствителен к кислотному гидролизу, чем соответствующий

бисэфир. Однако Mdmr-группа, даже в ее эфирной форме, более лабильна, чем Mthp, и несовместима с условиями, используемыми на стадии детритилирования.

Растоги и Ушер использовали аналогичную идею, в результате чего ими была предложена (2,6-диметоксикарбонил)феноксиметильная группа [93]. Были получены два модельных димера UpU и UpG, в которых 2'-гидроксильная функция 5'-концевого остатка урацила была защищена данной группы, и авторы использовали их для исследования скорости реакции гидролиза ацетальной связи. Оказалось, что превращение бисэфира в бискарбоновую кислоту при действии водного 0.2 М NaOH увеличивало скорость последующего кислотного гидролиза в 42 раза при pH 1.0, и в 1320 раз при pH 3.0, т.е. в виде бисэфира данная группа более стабильна, чем Fmmp-, Ctmr- и Mthp-группы, но становится более чувствительной к кислотному гидролизу после омыления сложноэфирных групп.

Матисиак и др. провели исследование по влиянию различных заместителей на гидролитическую стабильность ацеталей нуклеозидов [94]. Для этого они осуществили синтез большого количества нуклеозидных производных, несущих во втором положении остатка рибозы ацетальные системы (27) и (28) с различными заместителями R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ и R⁷. На наборе уридиновых производных, содержащих в 2'-положении данные системы, проводилось изучение скорости расщепления ацетальной связи в кислых условиях (80% уксусная кислота или 0.05М HCl в смеси H₂O/CH₃OH) и влияния на эту скорость различных заместителей. Группы (29) и (30), в данном исследовании не использовались, поскольку они удалялись по механизму β-элиминирования параллельно с удалением 3',5'-O-силоксановой группировки обработкой TBAF.

Формулы III

В результате для защиты 2'-ОН-функции были отобраны 1-{4-[[2-(4-нитрофенил)этокси]карбонил]окси}бензил}окси}этильная (Nebe) и 1-{3-фтор-4-[[2-(4-нитрофенил)этокси]карбонил]окси}бензил}окси}этильная (Fnebe) защитные группы, и показано, что они достаточно стабильны в процессе синтеза олигорибонуклеотидов и легко удаляются в мягких кислых условиях (1-3% уксусная кислота) после их превращения в 2'-O-1-[4-гидроксибензилокси]этильную (Hное) группу действием сильным основанием, таким как DBU.[95]. В результате исследований для твердофазного синтеза олигорибонуклеотидов были выбраны Fnebe для U, и Nebe - для C, A и G. С применением этих групп был синтезирован ряд олигорибонуклеотидов с хорошими выходами, а затем получен 37-звенный 3'-концевой фрагмент тРНК^{Ala} из *Saccharomyces cerevisiae* (с Thd- и ψgd-заменами).[95]

Пфляйдерером и сотр. было показано, что 2'-O-(2-цианоэтокси)этильная (CEE) группа (29) удаляется из нуклеозида обработкой TBAF [94]. По этой причине ими не был

осуществлен синтез содержащих данную группу мономеров и олигорибонуклеотидов. В свою очередь Умето и Вада проверили ее пригодность в качестве удаляемой фторид-ионами 2'-*O*-защитной группы на примере ряда динуклеозидмонофосфатов [96]. Следует отметить, что недостатком данной защитной группы является наличие ацетального асимметрического атома углерода, что приводит к смеси диастереомеров, и применение СЕЕ-группы не получило дальнейшего развития.

Гоф и др. предложили использовать для защиты 2'-гидроксильной группы (*o*-нитробензилокси)метильную (2-NBOM) и (*n*-нитробензилокси)метильную (4-NBOM) группы [97, 98], которые устойчивы к действию как кислот, так и оснований, причем первая из них удаляется при УФ-облучении, а вторая - при обработке ТВАФ. Эти группы являются аналогами *o*-нитробензильной и *n*-нитробензильной групп, но наличие в них оксиметильного линкера позволяет увеличить эффективность реакции межнуклеотидной конденсации за счет разнесения в пространстве данных группировок и вицинального амидофосфитного остатка.

2-NBOM-группа применялась в твердофазном амидофосфитном синтезе фрагментов РНК, в том числе трех фрагментов рибозимов. Однако следует отметить, что в случае олигонуклеотидов, содержащих большое число звеньев, наблюдалось только частичное деблокирование 2'-гидроксильной функции, поскольку образующийся в процессе деблокирования побочный продукт препятствовал удалению оставшихся 2'-*O*-(2-NBOM)-групп [97]. Применение 4-NBOM-группы позволило получить олигонуклеотид U-(U)₁₁-U со средним выходом на стадии межнуклеотидной конденсации 99% [99].

Также была исследована возможность использования 4-NBOM-группы и ее аналогов - 4-(*N*-дихлорацетил-*N*-метиламино)бензилоксиметильной (4-DCA-MAVOM) и 4-(*N,N*-диметиламинобензилокси)метильной (4-DABOM) групп для защиты 2'-ОН-функции в твердофазном синтезе фрагментов РНК [99,100]. На первом этапе основная идея заключалась в превращении 4-нитрофункции 4-NBOM-группы в 4-аминофункцию, обладающую положительным мезомерным эффектом (+*M*), что должно было бы облегчить расщепление ацетальной связи и приводило бы к образованию свободной гидроксильной функции. В качестве восстановителя нитрогрупп (4-NBOM)-защищенного (U₁₉dT) использовали TiCl₃ (рН 6.0). Образовавшаяся 2'-*O*-(4-аминобензилокси)метильная (4-ABOM) группа количественно удалялась обработкой 0.1М АсОН при 90°C без заметного расщепления олигонуклеотидной цепи. К несчастью, методика восстановления оказалась неэффективной для олигорибонуклеотидов со смешанной последовательностью оснований.

Дальнейший поиск аналогов привел к разработке 4-(*N*-дихлорацетил-*N*-метиламино)бензилоксиметильной (4-DCA-MAVOM) группы, которая вводится в процессе получения мономеров [99,100]. *N*-Защитная дихлорацетильная группа (DCA) удаляется параллельно с защитными группами гетероциклических оснований и фосфатного остатка и отщеплением олигонуклеотида с носителя и приводит к образованию 4-(*N*-метиламино)бензилоксиметильной (4-MAVOM) группы. При деблокировании 2'-ОН-функции было установлено, что хотя 4-MAVOM-группа стабильна в нейтральных и основных условиях, как и 4-ABOM-группа, она полностью удаляется в условиях деблокирования (0.1M AcOH, 90°C) приблизительно в три раза быстрее, чем последняя, и данная обработка не приводит к расщеплению и изомеризации межнуклеотидных связей [99]. Уже в другой работе 4-MAVOM-группа успешно использовалась в синтезе последовательности AUCCGUAGCUAACGUCAUGG [100].

Также была исследована возможность использования для блокировки 2'-гидроксильной функции 4-(диметиламино)бензилоксиметильной (4-DABOM) группы, которая неожиданно оказалась менее эффективной из-за более медленного ее удаления по сравнению с 4-MAVOM [99].

Винкотт и Усман проверили возможность применения в олигорибонуклеотидном синтезе [2-(триметилсилил)этокси]метильной (SEM) защитной группы, удаление которой они осуществляли обработкой эфиром трехфтористого бора ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) и получили полностью деблокированный (Up)_nU с выходом 74% [101]. Позднее были получены данные об удалении этой группы фторид-ионами, однако олигорибонуклеотиды с ее применением получены не были [102] и дальнейшего развития в химическом синтезе РНК-фрагментов SEM-группа не получила.

В качестве альтернативы TBDMS-группе Питч и др. ввели широко используемую в настоящее время (триизопропилсилил)оксиметильную (ТОМ) группу [103]. В отличие от первой, введение ТОМ-группы, содержащей -OCH₂-линкер, не приводит к увеличению времени и падению выходов по мере наращивания цепи олигорибонуклеотидов, и она количественно удаляется обработкой TBAF·3H₂O или Et₄NF·2H₂O в DMSO, DMF, NMP или их смеси с THF, причем смесь для деблокирования может содержать вплоть до 20% воды. Кроме того, из-за наличия Si-O-CH₂-O-фрагмента, она не способна мигрировать в основных условиях.

С использованием амидофосфитного метода был синтезирован ряд фрагментов РНК, длиной 60-80 нт, представляющих собой транспортные РНК, рибозимы и аптамеры. К недостаткам данной защитной группы следует отнести отсутствие региоселективного способа ее введения по 2'-гидроксильной функции –n по данным

авторов, выходы искомым продуктам на этой стадии составляют 25-60% в зависимости от структуры исходного соединения.

В качестве аналога СЕЕ-группы, обладающего аналогичными свойствами, но не содержащего асимметрического центра, была предложена удаляемая фторид-ионами (2-цианоэтокси)метильная (СЕМ) группа, которая является перспективным кандидатом для коммерческого использования [104, 105]. Несмотря на данные об ее частичном удалении (< 5%) при стандартной обработке водным аммиаком [104], авторы не наблюдали в этих условиях расщепления межнуклеотидных связей [105]. Это объясняется, по всей видимости, тем, что образующийся при удалении цианэтильной группировки и устойчивый в основных условиях гемиацеталь маскирует 2'-гидроксильную функцию и, следовательно, препятствует расщеплению межнуклеотидной связи. Кроме того, с ее использованием был получен самый длинный на настоящее время химически синтезированный 110-звенный РНК-олигомер с выходом 5.5%. [105].

Жоу и др. предположили, что частичное удаление 2'-О-СЕМ-группы будет приводить к расщеплению межнуклеотидных связей [106]. Поэтому их исследования были направлены на снижение кислотности протона, находящегося в α -положении к цианогруппе, для того чтобы увеличить стабильность 2'-О-защитной группы при деблокировании обработкой аммиаком или *N*-метиламином. В результате они ввели удаляемую фторид-ионами *para*-толилсульфонилэтоксиметильную (ТЕМ) группу и использовали ее в автоматическом твердофазном синтезе 38-звенной полиуридилевой кислоты и 21-звенного олигорибонуклеотида со смешанной последовательностью. Важным преимуществом стратегии синтеза с применением 2'-О-ТЕМ-группы является высокая чистота РНК продукта (>90%), который можно использовать в биологических исследованиях без дополнительной очистки.

Семенюк и др. предложили *tert*-бутилдитиометильную (DTM) группу, которая совместима со стандартными 5'-О-DMTr и СЕ-защитными группами, стабильна при обработке аммиаком, отщепляется в практически нейтральных гомогенных водных условиях и совместима с ВЭЖХ-очисткой олигорибонуклеотидов, содержащих на 5'-конце тритильную защитную группу [107]. После стандартной обработки аммиаком удаление 2'-О-DTM-группы с олигонуклеотидов осуществляется при рН 7.6 в растворе, содержащем 1,4-дителиотреитол (ДТТ) или трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), при 55°C в течение 90 мин. Предложенная авторами группа полностью совместима с 2'-О-силильными защитами, что позволяет вводить их одновременно в требуемом порядке и селективно удалять любую из них. Кроме того, при выдерживании 2'-О-DTM-защищенных олигорибонуклеотидов с сывороткой крови, было обнаружено, что

DTM-функция является биоразлагаемой, а, следовательно, для экспериментов *in vivo* полное ее удаление необязательно. К недостаткам следует отнести нестабильность DTM-амидитов, особенно G-производного, в ацетонитриле.

Томайя и др [108] разработали методику введения по 2'-ОН-функции остатка уридина биотинилированной фотоотщепляемой группы и получили соответствующий мономер для твердофазного синтеза олигорибонуклеотидов, у которого биотинилированная группировка отщеплялась при облучении УФ-светом. С использованием 2'-O-TBDMS-защищенных мономеров получена 21-звенная РНК со смешанной последовательностью оснований, содержащая 5'-концевое звено с данной группой. После удаления с носителя и деблокирования фосфатных и 2'-гидроксильных функций олигорибонуклеотид выделяли с использованием иммобилизованного стрептавидина. Облучение УФ-светом приводило к отщеплению 2'-O-биотинилированной группировки и высвобождению целевого продукта.

Ортоэфирные группировки являются следующим типом защитных групп 2'-гидроксильного остатка. Хата и Азизян описали бис(этокс)метильную и более устойчивую в кислых условиях бис(2-хлорэтокс)метильную группы, которые, однако, оказались несовместимыми со стандартными 5'-O-защитными группами [109]. На основе данной работы Скариндж и др. ввели ортоэфирную 2'-O-бис(2-ацетоксиэтокс)метильную (АСЕ) группу [110-113]. При соблюдении ряда условий АСЕ-группа устойчива в процессе твердофазного синтеза олигорибонуклеотидов, но при деблокировании остатков гетероциклических оснований и отщеплении олигомера с носителя происходит её омыление. Образующаяся при этом 2'-O-бис(2-гидроксиэтокс)метильная группа удаляется при pH 3.0-3.8 (10-30 мин, ~60°C) в 10 раз быстрее, чем АСЕ-группа, причем используемые условия не приводят к 2'→3'-изомеризации межнуклеотидных связей. Поскольку АСЕ-группировка неустойчива в условиях удаления тритильных групп, потребовалось введение специальных силильных 5'-O-защитных групп, удаляемых фторид-ионами [110], что, в свою очередь, потребовало замены стеклянных частей синтезаторов, которые не совместимы с обработкой TEA·3HF. Предложенные в работе [110] силильные 5'-O-защитные группы не позволяли отслеживать эффективность реакции межнуклеотидной конденсации, поэтому позднее была введена силильная группа, содержащая хромофор [113]. Одним из преимуществ АСЕ-стратегии является хорошая растворимость в воде РНК-олигомеров, содержащих после деблокирования гетероциклических оснований бис(2-гидроксиэтокс)метильную функцию, что позволяет осуществлять их выделение ВЭЖХ. Наконец, применение АСЕ-стратегии для получения длинных последовательностей РНК

(вплоть до 80 нт) несколько дешевле, чем в случае ее главных конкурентов – TBDMS- и ТОМ-групп.

Группы со сложноэфирным типом связи также были исследованы рядом авторов. Известно, что изомерные 2'- и 3'-*O*-ацилрибонуклеозидные производные взаимопревращаются в мягких основных условиях со смещением равновесия в сторону образования 3'-*O*-изомера [114]. В отличие от смеси 2'- и 3'-*O*-TBDMS-производных разделить смесь 2'- и 3'-*O*-эфиров стандартными хроматографическими методами практически невозможно. Кроме того, хроматография может сопровождаться ацильной миграцией. По этим причинам 2'-*O*-ацильные группы не нашли широкого применения, хотя Фромагеот и др. использовали бензоильную (Bz) группу в фосфодиэфирном методе синтеза ряда динуклеозидмонофосфатов [115], а Кемпе и др. в твердофазном синтезе олигорибонуклеотидов, но так как эти соединения содержали от 1 до 3% изомерных 2'-*O*-амидофосфитных мономеров, полученные олиго-РНК содержали и (2'→5')-межнуклеотидные связи [116].

Рознерс и др. описывали твердофазный синтез олигорибонуклеотидов из 2'-*O*-(2-хлорбензоил)-3'-*H*-фосфонатных мономеров [51,117]. После сборки целевой РНК 2'-*O*-защитные группы удаляли одновременно с отщеплением олигорибонуклеотидов с носителя и удалением *N*-защитных групп водным аммонолизом (5 ч, 25°C) в условиях, которые являются достаточно мягкими для того, чтобы избежать расщепления межнуклеотидных связей. Авторы провели ее сравнение с TBDMS-группой, по результатам которого она оказалась менее эффективной [51].

Недавно Лаки и др. [118] получили амидофосфитные мономеры, содержащие 2'-*O*-левулинильную (Lev) защитную группу, и синтезировали ряд олигорибонуклеотидов со средним выходом на стадии межнуклеотидной конденсации, равным 98.5%. Применение вместо стандартного сукцинильного гидрохинон-*O,O'*-диацетильного линкера (Q-линкер), позволяющего отщеплять олигонуклеотид с носителя обработкой фторид-ионами, делает возможным его деблокирование на колонке и, тем самым, облегчает и ускоряет последующую его очистку. Кроме того, при получении мономеров используется дешевая и легкодоступная 4-оксопентановая кислота.

Группы с ацетальэфирным типом связи были исследованы Лаки и др. при разработке синтеза РНК микрочипов *in situ* [119]. В 2009 г. появилось сообщение об использовании аналога левулинильной – ацетальлевулинилэфирной группы (ALE), которая имеет два преимущества: она не способна мигрировать благодаря наличию ацетальной функции и позволяет получать соответствующие 2'-*O*-ALE-мономеры с высокими выходами. Соединения (31) превращали в соответствующие α -хлорэфирные производные и конденсировали с левулинатом натрия в присутствии 15-краун-5 эфира

(схема 3). В случае производного гуанозина трансформацию метилтиометильной (МТМ) группы осуществляли обработкой 2'-*O*-МТМ-производного (**31**) ($B = \text{Gua}^{\text{Fmoc}}$) сульфурилхлоридом в присутствии 4-хлорстирола, с последующим добавлением карбоната цезия и левулиновой кислоты.

На следующем этапе *N*-Fmoc-защищенные производные с пуриновыми гетероциклическими основаниями превращали в *N*-Lev (в случае Ade) и *N*-Dmf (в случае Gua) производные типа (**33**). «Транзитная» защита Fmoc-группой необходима потому, что *N*-Lev и *N*-Dmf-группы на остатках аденина и гуанина не выдерживают условий введения МТМ-группы. С другой стороны, Fmoc не совместима с вводимой по 5'-гидроксильной функции 2-(2-нитрофенил)пропоксикарбонильной (NPPOC) защитной группой, т.к. обе эти группы удаляются в приблизительно одинаковых условиях. После десилилирования обработкой $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ и введения по 5'-ОН-функции DMTr- или NPPOC-группы, производные типа (**35**) фосфитилировали, получая мономеры типа (**36**) (схема 3). Олигорибонуклеотидный синтез проводили с использованием 4,5-дицианоимидазола в качестве активатора и гидрохинон-*O,O'*-диацетильного линкера (Q-линкер) для присоединения первого нуклеозида к носителю. После завершения синтеза и удаления цианэтильной фосфатзащитной группы одну часть носителя с олигонуклеотидом обрабатывали 0.5М раствором $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в смеси Py/AcOH, с последующей обработкой 1М TBAF в THF в течение 16 ч, а вторую - обрабатывали 1М TBAF для удаления олигомера с носителя и, после очистки обращено-фазовой ВЭЖХ, подвергали гидразинолизу. Оба метода дали одинаковые результаты без модификации оснований и расщепления и изомеризации межнуклеотидных связей. Было установлено, что при времени межнуклеотидной конденсации 1 и 10 мин средний выход на стадии наращивания олигонуклеотидной цепи с использованием ALE-стратегии (97.7 и 98.7%) превышал средние выходы TOM- (96.3 и 98.1%) и TBDMS-стратегий (94.7 и 98.4%), но был несколько меньше, чем в случае ACE-подхода (99.0%).

Поскольку ALE-группа содержит сложноэфирную функцию, обычно расщепляемую в клетках карбоксиэстеразами, она является потенциальным кандидатом для получения кРНК-пролекарств. В связи с этим, Джонсон и др. опубликовали работу по синтезу олигонуклеотида dT₉-U-dT₅, в котором остаток уридина содержал 2'-*O*-ALE-группу [120]. Однако авторы обнаружили частичное деблокирование 2'-*O*-гидроксильной функции в условиях удаления *P*-цианэтильной группы (TEA/ацетонитрил (2:3, v/v) и ВЭЖХ очистки и поэтому провели оптимизацию данных условий на модельном димере. Затем авторы решили проверить возможность применения ацетальных производных аланина (AAla), лизина (ALys) и фенилаланина (APhe) в качестве биологически совместимых 2'-*O*-защитных групп. Ключевая стадия получения содержащих

их амидофосфитных мономеров была аналогичной стадии введения 2'-*O*-ALE группы (схема 3) и включала активацию метилтиометильной группы, с последующей обработкой образующегося α -хлорэфира цезиевыми солями N-Fmoc-защищенных аминокислот. Однако, используя эти мономеры и подобранные ранее для ALE группы условия, авторам удалось синтезировать только олигонуклеотиды, содержащие APhe группу, единственную группу, оказавшуюся устойчивой в процессе синтеза и деблокирования.

Пэри и др. также проводили поиски 2'-*O*-биолабильной защитной группы, которая увеличивала бы стабильность РНК к расщеплению нуклеазами и, кроме того, усиливала бы способность олигонуклеотида проникать в клетку, благодаря своему липофильному характеру [121]. С этой целью авторы также выбрали ацетальэфирные группы, преимуществами которых является неспособность к изомеризации и большая, чем у широко используемых ацетальных групп, стабильность в протонных растворителях. Были синтезированы четыре полностью защищенных уридиновых производных (39), содержащих ацилоксиметильные группы (2'-*O*-ацилоксиметильную (AcOM) и 2'-*O*-пивалоилоксиметильную (PivOM)) и ацилтиометильные группы (2'-*O*-ацетилтиометильную (AcSM) и 2'-*O*-пивалоилтиометильную (PivSM)). Ключевая стадия включала получение α -хлорэфира (38), с последующей обработкой его ацетатом или тиоацетатом калия в присутствии 18-краун-6 для получения 2'-*O*-AcOM- или 2'-*O*-AcSM-уридинового производного (39), или пивалатом или тиопивалатом натрия в присутствии 15-краун-5 для получения 2'-*O*-PivOM или 2'-*O*-PivSM производного (39), соответственно (схема 4). Дальнейшее десилилирование, диметокситрилирование и фосфитилирование давали соответствующие мономеры. Т.к. данные группы не совместимы с условиями удаления цианэтильной группы, для защиты атома фосфора использовали 2-(триметилсилил)этильную группу (TSE), удаляемую действием фторид-ионов. Кроме того, по тем же причинам, вместо стандартного сукцинильного линкера на носителе использовали линкер, отщепляемый при воздействии световым излучением.

Для оценки пригодности данных 2'-*O*-защитных групп в качестве биолабильных были синтезированы гомоуридиновые гексамеры (U_6) и додекамеры (U_{12}). Затем исследовалась кинетика удаления 2'-*O*-защитных групп в присутствии эстеразы из печени свиньи (PLE), S_1 -нуклеазы, 3'- и 5'-экзонуклеаз (фосфодиэстеразы змеиного яда и фосфодиэстеразы селезенки крупного рогатого скота) и суммарного клеточного экстракта из СЕМ-SS-клеток, используемого в качестве имитатора внутриклеточной среды. Также исследовалась эффективность их удаления карбоксиэстеразами и гибридизационные свойства. В результате оказалось, что наилучшими показателями

обладают олигоуридилаты, содержащие ацетилоксиметильную (AcOM) и пивалоилоксиметильную (PivOM) группы.

В следующей работе авторы предприняли синтез олигоуридилатов, которые частично или полностью функционализированы 2'-O-PivOM-группами, и подобрали условия эффективного расщепления Q-линкера (48% HF/TEA, 1:3, v/v; 65°C) [122]. Для повышения выходов реакции межнуклеотидной конденсации используемая ранее P-защитная TSE-группа была заменена стандартной CE, которую авторы удаляли обработкой пиридином [122] или DBU [123], не затрагивая PivOM-группы. Наконец, исследования термодинамической стабильности дуплексов, образованных этими олигорибонуклеотидами с РНК-мишенью, показали, что для ее увеличения предпочтительно последовательное расположение 2'-O-PivOM-модифицированных остатков в цепи олигонуклеотида.

Совсем недавно был осуществлен также синтез ряда 21-звенных олигорибонуклеотидов со смешанной последовательностью оснований, которые полностью или частично модифицированы биолабильной 2'-O-PivOM-группой [123]. Для этого был использован Q-линкер и 2'-O-PivOM- и 2'-O-TBDMS-защищенные амидофосфитные мономеры, содержащие удаляемую фторид-ионами [(триизопропилсилил)окси]-бензилоксикарбонильную (Tboc) группу, в случае цитидина и аденозина, тогда как экзо-аминофункцию производного гуанозина защищали DMTr-группой или оставляли незащищенной. Биологические исследования одного из частично 2'-O-PivOM-модифицированных олигорибонуклеотидов показали, что он функционирует как предшественник биологически активной кРНК и способен лучше проникать в клетки, чем природный олигорибонуклеотид.

Мартин и др. предложили три новые биолабильные ацетальэфирные группы: изобутирилоксиметильную (*i*BuOM), бутирилоксиметильную (BuOM) и пропионилоксиметильную (PrOM), которые вводились в олигоуридилаты с длиной цепи 5, 11 и 19 звеньев [124]. Исследовалась их чувствительность к действию аммиака, способность образовывать дуплексы с комплементарными фрагментами РНК и способность удаляться клеточными карбоксиэстеразами. Введение данных групп по 2'-гидроксильной функции (схема 4) и получение соответствующих амидофосфитных мономеров осуществлялось по методу, описанному в работе [121], с тем исключением, что вместо 2-(триметилсилил)этильной группы (TSE), использовалась 2-цианэтильная (CE) группа. Пригодность в качестве 2'-O-защитных групп проверялась на U₁₉T-последовательностях, причем продолжительность обработки аммиаком, требуемая для их полного удаления уменьшалась в ряду PivOM, *i*BuOM, BuOM, и для PrOM и AcOM составляла менее 5 мин. Исследование гибридизационных свойств показало, что только

PivOM-U₁₁T образует более стабильный дуплекс ($T_{пл}$ 22,5 °С) с комплементарным олигонуклеотидом, чем немодифицированный U₁₁T ($T_{пл}$ 16,5 °С). Оценка стабильности U₅T в суммарном клеточном экстракте TSA-клеток показала, что полупериод расщепления клеточными карбоксиэстеразами PivOM группы составлял 147 мин для *i*BuOM, PrOM и AcOM - около 70 мин, а для BuOM - 385 мин. При этом в случае BuOM-группы деблокирование 2'-ОН-функции протекало намного медленнее, чем гидролиз олигомера нуклеазами. Во всех остальных случаях скорость гидролиза нуклеазами была пропорциональна скорости удаления 2'-O-защитной группы. Поскольку скорости удаления *i*BuOM, PrOM и AcOM в клеточных экстрактах практически одинаковы, выбор подходящей защитной группы определялся ее химической стабильностью (AcOM < PrOM < *i*BuOM) при обработке фторид-ионами для удаления олигонуклеотида с носителя. Таким образом, в качестве альтернативы PivOM-группы выбор падал на *i*BuOM-группу, которая быстро удаляется клеточными карбоксиэстеразами.

В других работах те же авторы использовали 2'-O-PivOM-защитную группу для химического синтеза природных фрагментов РНК [125-127]. В этом случае PivOM-группу удаляли одновременно с отщеплением олигорибонуклеотидов с носителя и удалением защитных групп с гетероциклических оснований обработкой водным аммиаком, что не сопровождалось изомеризацией или расщеплением межнуклеотидных связей.

В качестве альтернативы региоселективному способу введения PivOM-группы был предложен новый способ введения, включающий три стадии [125]. Ключевой стадией было активация 3'-ОН- и 2'-ОН-функций соединения (40) оксидом дибутилолова с последующей обработкой дешевым имеющимся в продаже пивалоилоксиметилхлоридом (PivOM-Cl), в результате чего получалась смесь 3'- и 2'-O-изомеров (42) и (43), которую можно было разделить с помощью хроматографии (схема 4). В работе [127] для введения PivOM-группы в аденозиновое производное (40) авторы предложили использовать более эффективный для этой цели пивалоилоксиметилйодид (PivOM-I).

После фосфитилирования выделенных 2'-O-изомеров (43) полученные мономеры использовали в синтезе ряда РНК с длиной цепи до 21 нт. Синтез протекал с высокими средними выходами реакции межнуклеотидной конденсации (>99%). Для удаления защитных групп фосфатного остатка с одинаковой высокой эффективностью использовали DBU в сухом THF или пиперидин в CH₃CN. Обработка водным аммиаком приводила к одновременному высвобождению олигонуклеотида с носителя, удалению 2'-O-защитных групп и защитных групп с гетероциклических оснований. Было обнаружено, что в результате обработки аммиаком олигонуклеотидов, содержащих

остатки гуанозина, протекает образование нежелательных продуктов присоединения молекулы формальдегида, но данную реакцию удалось подавить добавлением изопропиламина.

Тионокарбаматные группы были недавно описаны для блокирования 2'-гидроксильной функции. Использовался тот факт, что кислотность гидроксильной группы может значительно уменьшаться с понижением полярности (диэлектрической постоянной) растворителя, например при переходе от воды к ацетонитрилу, тогда как основность аминов при данном переходе увеличивается незначительно [128]. Таким образом, можно подобрать амин, чьи нуклеофильные свойства позволят осуществлять деблокирование и отщепление олигорибонуклеотида с носителя, не вызывая расщепление межнуклетидных связей. Для этого они провели скрининг удаляемых обработкой нуклеофилом 2'-*O*-защитных групп карбонильного и тионильного типа, руководствуясь рядом требований, в том числе необходимыми условиями являлись высокий выход на стадии введения данной группы в 3',5'-*O*-тетраизопропилдисилоксан-защищенные нуклеозиды (44), отсутствие 2'→3'-миграции на стадии удаления силоксана при обработке фторид-ионами, количественное удаление 2'-*O*-защитной группы обработкой алкиламином.

В результате из неарильных тиокарбонатов, третичных карбонатов, карбаматов и тионокарбаматов были отобраны защитные группы на основе тионокарбаматов вторичных аминов, из которых наиболее перспективным кандидатом оказалась тиоморфолин-1,1-диоксидтионокарбаматная (ТС) группа, количественно удаляемая с привязанного к CPG-носителю модельного олигорибонуклеотида (UT₁₅), в течение двух часов обработкой безводным этилендиамином. Далее авторы разработали схему получения всех четырех амидофосфитных мономеров типа (48), ключевой стадией которой была обработка 3',5'-*O*-тетраизопропилдисилоксан-защищенных нуклеозидов (44) 1,1'-тиокарбонилимидазолом, с последующим замещением имидазольного остатка производного (45) тиоморфолин-1,1-диоксидом (схема 5).

Мономеры (48) использовались в синтезе олигорибонуклеотидов со смешанной последовательностью оснований и 54-звенного минимального рибозима типа "головка молота". Деблокирование и удаление олигорибонуклеотидов с носителя осуществляли обработкой чистым EDA при комнатной температуре в течение 2 ч. После удаления EDA промывкой колонки ацетонитрилом, полностью деблокированные олигорибонуклеотиды, адсорбированные на CPG, смывали водой. С помощью ионообменной ВЭЖХ и LC/MS было установлено, что качество синтезированных таким образом продуктов сравнимо с качеством фрагментов РНК, полученных с применением

TBDMS-защищенных мономеров, а кроме того, было показано, что 5'-звеньевой рибозим осуществляет самосплайсинг в присутствии ионов Mg^{2+} .

Азидосодержащие группировки удовлетворяют одному из основных требований, предъявляемым к 2'-*O*-защитным группам, поскольку способны обеспечить стабильность олигорибонуклеотидов на стадии их удаления ввиду возможности использования для этого нейтральных или близких к ним условий [8-10]. Примерами таких групп являются азидометильная (AZM) и (2-азидометил)бензоильная (AZMB), которые удаляются в две стадии при обработке тризамещенным фосфином в водно-органической среде. Однако они не нашли применения в амидофосфитном методе синтеза, поскольку азидная группа отрицательно влияет на эффективность межнуклеотидной конденсации, вследствие образования иминофосфорана по реакции Штаудингера [129]. Использование фосфотриэфирного метода на основе *O*-нуклеофильного внутримолекулярного катализа позволило Ефимову и др. синтезировать ряд 2'-*O*-AZM-защищенных мономеров (**54**) ($R = AZM$), содержащих в случае остатков аденина, цитозина и гуанозина как стандартные группы ацильного типа [34, 35], так и AZMB-группу [130] (схема 6). Кроме того, был получен 2'-*O*-AZMB-защищенный уридиновый мономер (**54**) ($B = Ura, R = AZMB$) [35]. Введение AZM-группы осуществлялось обработкой 2'-*O*-MTM-производных (**31**) NBS-Cl, и затем 1M раствором LiN_3 в DMF. Для того чтобы избежать побочной реакции взаимодействия α -хлорэфира, образующего при обработке производного (**31**) NBS-Cl, и N3-атома гетероциклов пуринового ряда, в случае производных аденозина и гуанозина введение AZM-группы проводилось в присутствии TfOH. AZMB-группу вводили обработкой соединения (**50**) AZMB-Cl в присутствии 1-метилимидазола.

На примере соединения (**51**) было показано, что обработка его 1 M TBAF в THF не приводит к миграции AZMB-группы с 2'- на 3'-гидроксильную функцию, что наблюдается в случае других защитных групп ацильного типа. После десилилирования 5'- и 3'-гидроксильных функций и введения 5'-*O*-DMTr-группы, проводилось введение фосфатного остатка, содержащего каталитическую 4-метокси-1-оксидо-2-пиколильную группу, обработкой соответствующим фосфодиэфиром (**55**) в присутствии конденсирующего реагента, с последующим избирательным удалением 2-хлорфенильной или метильной фосфат-защитной группы.

Мономеры (**54**) использовались в твердофазном синтезе фрагментов РНК фосфотриэфирным методом с *O*-нуклеофильным внутримолекулярным катализом. Было установлено, что время реакции межнуклеотидной конденсации, средние выходы и чистота полученных олигорибонуклеотидов, в случае применения AZM-группы, были сравнимы с выходами олигорибонуклеотидов, полученными с применением коммерческих

амидофосфитных мономеров. В свою очередь, применение объемной 2'-*O*-AZMB-защитной группы приводило к увеличению времени реакции межнуклеотидной конденсации и, как следствие, к падению суммарного выхода полиуридилата. В результате можно сделать вывод, что фосфотриэфирный подход с применением *O*-нуклеофильного внутримолекулярного катализа и 2'-*O*-AZM группа является хорошей альтернативой широко применяемому в настоящее время амидофосфитному способу синтеза фрагментов РНК.

4. Заключение

Таким образом, в последнее время предложено большое количество 2'-*O*-защитных групп для рибонуклеотидов, которые используются, как правило, в амидофосфитном методе синтеза фрагментов РНК. Однако, несмотря на достигнутые в данной области успехи, до сих пор еще не разработана универсальная защитная группа для 2'-ОН-функций нуклеотидов, а предложенные на данный момент 2'-*O*-защитные группы обладают теми или иными недостатками, что делает актуальным разработку новых 2'-*O*-защитных групп и альтернативных методов синтеза фрагментов РНК. Интенсивный рост числа публикаций по этой теме подтверждает сделанные выводы.

Список литературы.

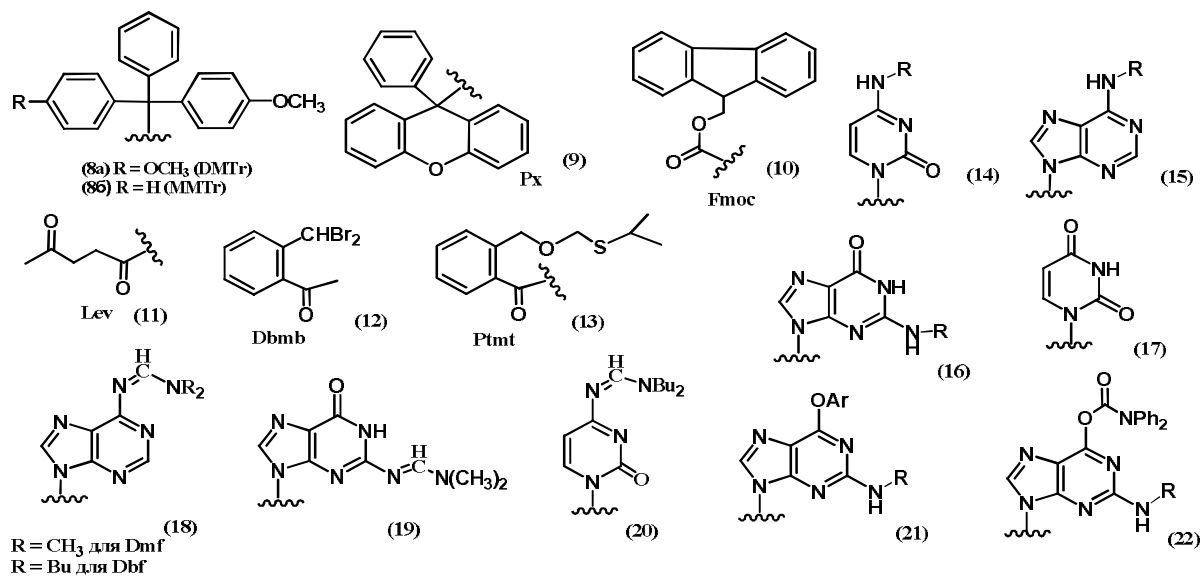
1. Yan A.C., Bell K.M., Breeden M.M., Ellington A.D. // *Front. Biosci.* 2005. V. 10. P. 1802–1827.
2. Bevilacqua P.C., Yajima R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006. V.10. P. 455–464.
3. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. // *Nature.* 1998. V. 391. P. 806–811.
4. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. // *Nature.* 2001. V. 411. P. 494–498.
5. Dorsett Y., Tuschl T. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2004. V. 3. P. 318–329.
6. Bartel D.P. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 281–297.
7. Reese C.B. // *Tetrahedron.* 1978. V. 34. P. 3143–3179.
8. Oivanen M., Kuusela S., Loennberg H. // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 961–990.
9. Acharya S., Foldesi A., Chattopadhyaya J. // *J. Org. Chem.* 2003. V. 68. P. 1906–1910.
10. Li Y. F., Breaker R. R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 5364–5372.
11. Reese C.B. // *Org. Biomol. Chem.* 2005. V. 3. P. 3851 – 3868.
12. Zon G. // *Can. J. Chem.* 2007. V.85. P. 257-260.
13. Somoza A. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 2668-2675.
14. Beaucage S.L., Reese C.B. // *In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry / Eds Egli M., Herdewijn P., Matusda A., Sanghvi Y.S. Wiley.* 2009. P. 2.16.1–2.16.31.
15. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 3821–3827.
16. Chattopadhyaya J.B., Reese C.B. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1978. P. 639–640.
17. Sonveaux E. // *In Protocols for Oligonucleotide Conjugates: Synthesis and Analytical Techniques / Ed Agrawal S. Totowa, N.J.: Humana Press.* 1994. P. 1–71.
18. Pathak T., Chattopadhyaya J. // *Acta Chem. Scand. B.* 1985. V. 39. P. 799–806.
19. van Boom J.H., Burgers P.M.J. // *Tetrahedron Lett.* 1976. P. 4875–4878.
20. Chattopadhyaya J.B., Reese C.B., Todd A.H. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1979. P. 987–988.
21. Brown J.M., Christodoulou C., Jones S.S., Modak A.S., Reese C.B., Sibanda S., Ubasawa A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1989. V. 1. P. 1735–1750.
22. Rao M.V., Reese C.B., Schehlmann V., Yu P.S. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1993. V. 1. P. 43–55.
23. Vinayak R., Anderson P., McCollum C., Hampel A. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 1265–1269.
24. McBride L.J., Kierzek R., Beaucage S.L., Caruther M.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 2040-2048.
25. Ohkubo A., Kuwayama Y., Nishino Y., Tsunoda H., Seio K., Sekine M. // *Org. Lett.* 2010. V. 12. P. 2496-2499.
26. Jones S.S., Reese C.B., Sibanda S., Ubasawa A. // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. P. 4755–4758.
27. Reese C.B., Skone P.A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1984. V. 1. P. 1263–1271.
28. Reese C.B., Zard L. // *Nucleic Acids Res.* 1981. V. 9. P. 4611–4626.
29. Kamimura T., Tsuchiya M., Urakami K., Koura K., Sekine M., Shinozaki K., Miura K., Hata T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 4552–4557.
30. Sinha N.O., Biernat J., Köster H. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 5843–5846.

31. Reese C.B. // *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci.* 1970. V. 182. P. 319–328.
32. Reese C.B., Titmas R.C., Yau L. // *Tetrahedron Lett.* 1978. V. 30. P. 2727–2730.
33. Honda S., Urakami K., Koura K., Terada K., Sato Y., Kohno K., Sekine M., Hata T. // *Tetrahedron.* 1984. V. 40. P. 153–163.
34. Efimov V.A., Aralov A.V., Fedunin C.D., Klykov V.N., Chakhmakhcheva O.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 250–253 (Ефимов В.А., Аралов А.В., Федюнин С.Д., Клыков В.Н., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. Химия.* 2009. Т.35. С. 270-273).
35. Efimov V.A., Aralov A.V., Klykov V.N., Chakhmakhcheva O.G. // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2009. V. 28. P. 846–865.
36. Griffin B.E., Reese C.B., Stephenson G.F., Trentham D.R. // *Tetrahedron Lett.* 1966. P. 4349–4354.
37. Reitz G., Pfeleiderer W. // *Chem. Ber.* 1975. V. 108. P. 2878–2894.
38. Ohtsuka E., Tanaka S., Ikehara M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1978. V. 100. P. 8210–8213.
39. Hayes J.A., Brunden M.J., Gilham P.T., Gough G.R. // *Tetrahedron Lett.* 1985. V. 26. P. 2407–2410.
40. Ohtsuka E., Iwai S. // *In Synthesis and Applications of DNA and RNA* / Ed Narang S.A. San Diego: Acad. Press. 1987. P. 115–136.
41. Takaku H., Kamaike K. // *Chem. Lett.* 1982. P. 189–192.
42. Takaku H., Kamaike K., Tsuchiya H. // *J. Org. Chem.* 1984. V. 49. P. 51–56.
43. Takaku H., Ito T., Iwai K. // *Chem. Lett.* 1986. P. 1005–1008.
44. Klösel R., König S., Lahnhoff S., Karl R.M. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 52. P. 1493–1502.
45. Saneyoshi H., Ando K., Seio K., Sekine M. // *Tetrahedron.* 2007. V. 63. P. 11195–11203.
46. Tanaka S., Hirakawa T., Oishi K., Hayakawa Y., Kitamura M. // *Tetrahedron Lett.* 2007. V. 48. P. 7320–7322.
47. Stork G., Hudrlik P.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1968. V. 90. P. 4462–4464.
48. Corey E.J., Venkateswarlu A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. P. 6190–6191.
49. Ogilvie K.K., Sadana K.L., Thompson A.E., Quillian M.A., Westmore J.B. // *Tetrahedron Lett.* 1974. P. 2861–2863.
50. Damha M.J., Ogilvie K.K. // *In Protocols for Oligonucleotides and Analogs* / Ed Agrawal S. Totowa, N.J.: Humana Press. 1993. P. 81–114.
51. Rozners E., Westman W., Stromberg R. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22 P. 94-99.
52. Sproat B.S., Calonna F., Mullah B., Tsou D., Andrus A., Hampel A., Vinayak R. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1995. V. 14. P. 255–273.
53. Brown T., Brown D.J.S. // *Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach* / Ed Eckstein F. Oxford: IRL Press. 1991. P. 1–24.
54. Stawinski J., Strömberg R., Thelin M., Westman E. // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9285–9298.
55. Chaix C., Molko D., Téoule R. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 71–74.
56. Mullah B., Andrus A. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1996. V. 15. P. 419–430.
57. Goodwin J.T., Stanick W.A., Glick G.D. // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 7941–7943.
58. Wincott F., DiRenzo A., Shaffer C., Grimm S., Tracz D., Workman C., Sweedler D., Gonzalez C., Scaringe S., Usman N. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2677–2684.
59. Gasparutto D., Livache T., Bazin H., Duplaa A.-M., Guy A., Khorlin A., Molko D., Roget A., Téoule R. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 5159–5166.
60. Westman E., Strömberg R. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2430–2431.
61. Zewge D., Gosselin F., Sidler R., DiMichele L., Cvetovich R. J. // *J. Org. Chem.* 2010. V. 75. P. 5305–5307.

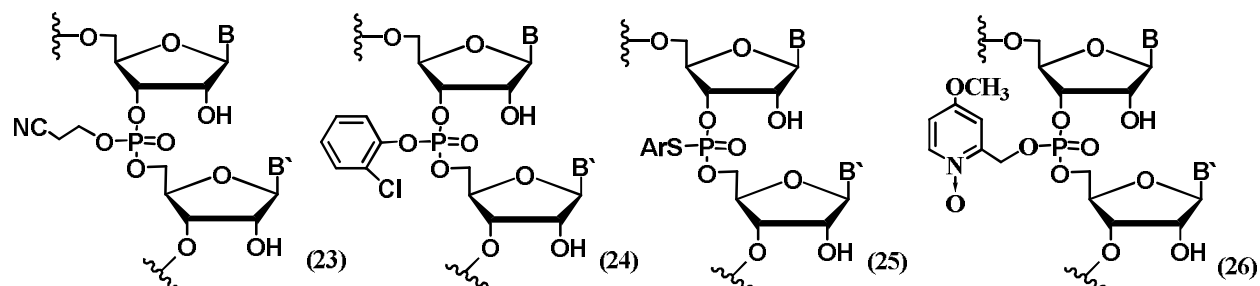
62. Schirmeister H., Pfeleiderer W. // *Helv. Chim. Acta.* 1994. V. 77. P. 10-22.
63. Pfister M., Schirmeister H., Mohr M., Farkas S., Stengele K.-P., Reiner T., Dunkel M., Gokhale S., Charubala R., Pfeleiderer W. // *Helv. Chim. Acta.* 1995. V. 7. P. 1705–1737.
64. Capaldi D.C., Reese C.B. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2209–2216.
65. Smith M., Rammler D.H., Goldberg I.H., Khorana H.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1962. V. 84. P. 430–440.
66. Smrt J., Šorm F. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1962. V. 27. P. 73–86.
67. Griffin B.E., Reese C.B. // *Tetrahedron Lett.* 1964. P. 2925–2931.
68. Reese C.B., Saffhill R., Sulston J.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. V. 89. P. 3366–3368.
69. Reese C.B., Saffhill R., Sulston J.E. // *Tetrahedron.* 1970. V. 26. P. 1023–1030.
70. Norman D.G., Reese C.B., Serafinowska H.T. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 3015–3018.
71. Jones S.S., Rayner B., Reese C.B., Ubasawa A., Ubasawa M. // *Tetrahedron.* 1980. V. 36. P. 3075–3085.
72. Jones S.S., Reese C.B., Sibanda S. // *Current Trends in Organic Synthesis* / Ed Nozaki H. Oxford: Pergamon Press. 1983. P. 71–81.
73. Brown J.M., Christodoulou C., Modak A.S., Reese C.B., Serafinowska H.T. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1989. V. 1. P. 1751–1767.
74. Ohtsuka E., Yamane A., Doi T., Ikehara M. // *Tetrahedron.* 1984. V. 40. P. 47–57.
75. Kruse C.G., Jonkers F.L., Dert V., van der Gen A. // *Rec. Trav. Chim.* 1979. V. 98. P. 371–380.
76. Christodoulou C., Agrawal S., Gait M.J. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 1521–1522.
77. Reese C.B., Skone P.A. // *Nucleic Acids Res.* 1985. V. 13. P. 5215–5231.
78. Kierzek R. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1994. V. 13. P. 1757–1768.
79. Iwai S., Ohtsuka E. // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9443–9456.
80. Lehmann C., Xu Y.-Z., Christodoulou C., Tan Z.-K., Gait M.J. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 2379–2390.
81. Reese C.B., Serafinowska H.T., Zappia G. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 2291–2294.
82. Rao T.S., Reese C.B., Serafinowska H.T., Takaku H., Zappia G. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 4897–4900.
83. Sakatsume O., Ohtsuki M., Takaku H., Reese C.B. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 3689–3697.
84. Reese C.B., Thompson E.A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1988. V. 1. P. 2881–2885.
85. Beijer B., Sulston I., Sproat B.S., Rider P., Lamond A.I., Neuner P. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5143–5151.
86. Pieleś U., Beijer B., Bohmann K., Weston S., O'Loughlin S., Adam V., Sproat B.S. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1994. V. 1. P. 3423–3429.
87. Sproat B.S., Beijer B., Groetli M., Ryder U., Morand K.L., Lamond A.I. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1994. V. 1. P. 419–431.
88. Rao M.V., Macfarlane K. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1995. V.14. P. 911–915.
89. McGregor A., Rao M.V., Duckworth G., Stockley P.G., Connolly B.A. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3173–3180.
90. Lloyd W., Reese C.B., Song Q., Vandersteen A.M., Visintin C., Zhang P.-Z. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 2000. V. 1. P. 165–176.
91. Pon R.T., Yu S., Prabhavalkar T., Mishra T., Kulkarni B., Sanghvi Y.S. // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2005. V. 24. P. 777–781.

92. Sandström A., Kwiatkowski M., Chattopadhyaya J. // *Acta Chem. Scand. B*. 1985. V. 39. P. 273–290.
93. Rastogi H., Usher D.A. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 4872–4877.
94. Matysiak M., Fitznar H.-P., Schnell R., Pfeleiderer W. // *Helv. Chim. Acta*. 1998. V. 81. P. 1545–1566.
95. Matysiak M., Pfeleiderer W. // *Helv. Chim. Acta*. 2001. V. 84. P. 1066–1085.
96. Umemoto T., Wada T. // *Tetrahedron Lett.* 2004. V. 45. P. 9529–9531.
97. Schwartz M.E., Breaker R.R., Asteriadis G.T., de-Bear J.S., Gough G.R. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992. V. 2. P. 1019–1024.
98. Gough G.R., Miller T.J., Mantick N.A. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 981–982.
99. Cieślak J., Kauffman J.S., Kolodziejski M, J., Lloyd J.R., Beaucage S.L. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 671–674.
100. Cieślak J., Grajkowski A., Kauffman J.S., Duff R.J., Beaucage S. L. // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 2774–2783.
101. Wincott F.E., Usman N. // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 6827–6830.
102. Wada T., Tobe M., Nagayama T., Furusawa K., Sekine M. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 1683–1684.
103. Pitsch S., Weiss P.A., Jenny L., Stutz A., Wu X. // *Helv. Chim. Acta*. 2001. V. 84. P. 3773–3795.
104. Ohgi T., Masutomi Y., Ishiyama K., Kitagawa H., Shiba Y., Yano J. // *Org. Lett.* 2005. V. 7. P. 3477–3480.
105. Shiba Y., Masuda H., Watanabe N., Ego T., Takagaki K., Ishiyama K., Ohgi T., Yano J. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3287–3296.
106. Zhou C., Honcharenko D., Chattapadhyaya J. // *J. Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. P. 333–343.
107. Semenyuk A., Földesi A., Johansson T., Estmer-Nilsson C., Blomgren P., Brännvall M., Kirsebom L., Kwiatkowski M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 12356–12357.
108. Tomaya K., Takahashi M., Minakawa N., Matsuda A. // *Org Lett.* 2010. V. 12. P. 3836–3839.
109. Hata T., Azizian J. // *Tetrahedron Lett.* 1969. V. 51. P. 4443–4446.
110. Scaringe S.A., Wincott F.E., Caruthers M.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 11820–11821.
111. Scaringe S.A. // *Methods* 2001. V. 23. P. 206–217.
112. Hartsel S.A., Kitchen D.E., Scaringe S.S., Marshall W.S. // *In Methods in Molecular Biology* // Ed Herdewijn P. Totowa, N.J.: Humana Press. 2005. V. 288. P. 33–49.
113. Scaringe S.A., Kitchen D., Kaiser R.J., Marshall W.S. // *In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* / Eds Egli M., Herdewijn P., Matusda A., Sanghvi Y.S. Wiley. 2004. P. 2.10.1–2.10.16.
114. Reese C.B., Trentham D.R. // *Tetrahedron Lett.* 1965. P. 2467–2472.
115. Fromageot H.P.M., Reese C.B., Sulston J.E. // *Tetrahedron*. 1968. V. 24. P. 3533–3540.
116. Kempe T., Chow F., Sundquist W.I., Nardi T.J., Paulson B., Peterson S.M. // *Nucleic Acids Res.* 1982. V. 10. P. 6695–6714.
117. Rozners E., Renhofa R., Petrova M., Popelis J. Kumpins V., Bizdena E. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1992. V. 11. P. 1579–1593.
118. Lackey J.G., Sabatino D., Damha M.J. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 789–792.
119. Lackey J. G., Mitra D., Somoza M.M., Cerrina F., Damha M.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 8496–8502.

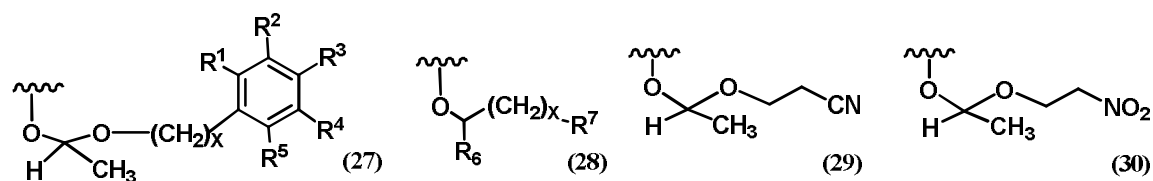
120. *Johnsson R., Lackey J. G., Bogojeski J.J., Damha M.J.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. P. 3721–3725.
121. *Parey N., Baraguey C., Vasseur J.-J., Debart F.* // *Org. Lett.* 2006. V. 8. P. 3869–3872.
122. *Lavergne T., Parey N., Vasseur J.-J., Debart F.* // *Eur. J. Org. Chem.* 2009. V. P. 2190–2194.
123. *Lavergne T., Baraguey C., Dupouy C., Parey N., Wuensche W., Sczakiel G., Vasseur J.-J., Debart F.* // *J. Org. Chem.* 2011. V. 76. P. 5719-5731.
124. *Martin A.R., Lavergne T., Vasseur J.-J., Debart F.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. P. 4046–4049.
125. *Lavergne T., Bertrand J.-R., Vasseur J.-J., Debart F.* // *Chem. Eur. J.* 2008. V. 14. P. 9135–9138.
126. *Lavergne T., Martin A., Debart F., Vasseur J.-J.* // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2008. V. 52. P. 51-52.
127. *Lavergne T., Janin M., Dupouy C., Vasseur J.-J., Debart F.* // *In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* / Eds Egli M., Herdewijn P., Matusda A., Sanghvi Y.S. Wiley. 2010. P. 3.19.1-3.19.27.
128. *Dellinger D.J., Timar Z., Myerson J., Sierzchala A.B., Turner J., Ferreira F., Kupihar Z., Dellinger G., Hill K.W., Powell J.A., Sampson J.R., Caruthers M.H.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 11540–11556.
129. *Wada T., Mochizuki A., Higashiya S., Tsuruoka H., Kawahar S., Ishikawa M., Sekine M.* // *Tetrahedron Lett.* 2001. V. 42. P. 9215-9219.
130. *Efimov V.A., Aralov A.V., Grachev S.A., Chakhmakhcheva O.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 628–633 (*Ефимов В.А., Аралов А.В., Грачев С.А., Чахмахчева О.Г.* // *Биоорган. Химия.* 2010. Т.36. С. 681-687).

ФОРМУЛЫ

Формулы I. Используемые в синтезе олигорибонуклеотидов защитные группы для 5'-гидроксильной функции и гетероциклических оснований.



Формулы II. Используемые в синтезе олигорибонуклеотидов защитные группы для межнуклеотидных фосфатных остатков.



Формулы III. Общая структура исследуемых ацетальных систем (а) и группы, удаляемые обработкой TBAF (б).

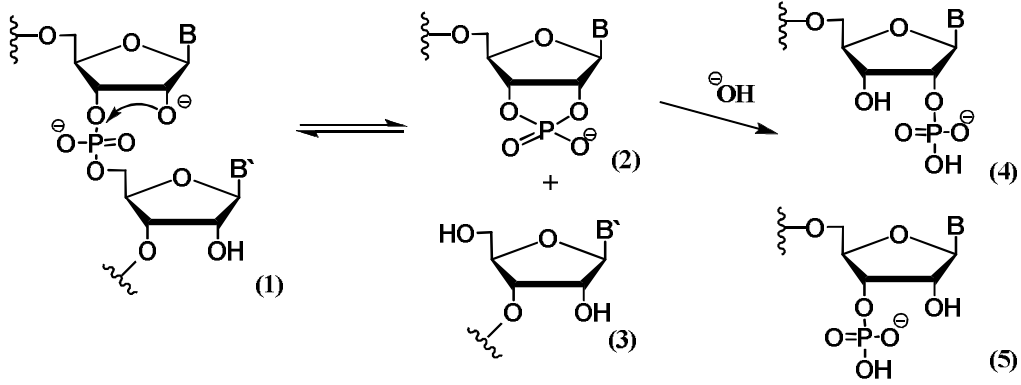
СХЕМЫ

Схема 1. Расщепление межнуклеотидной связи в основных условиях.

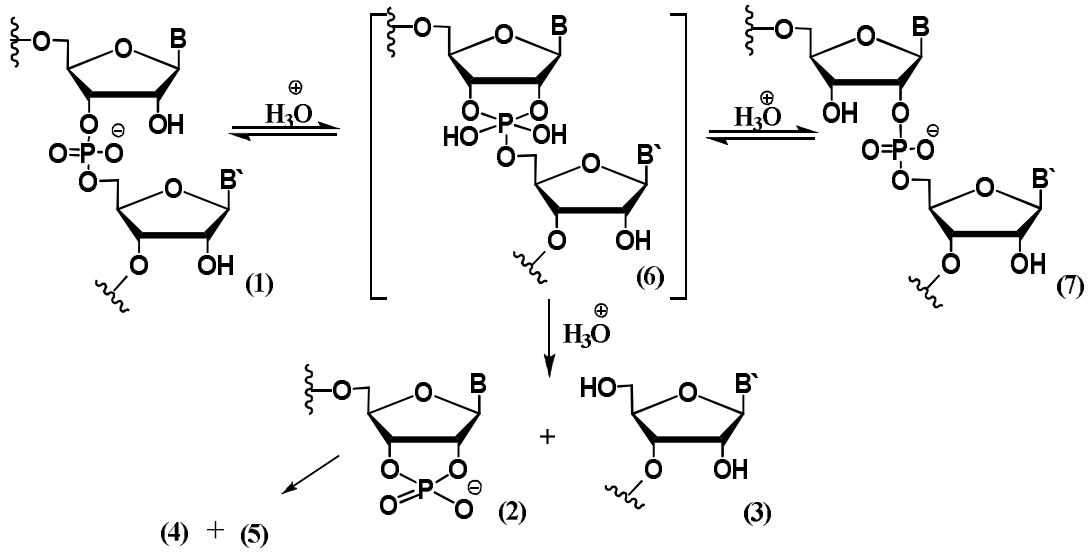


Схема 2. Расщепление и миграция межнуклеотидной связи в кислых условиях.

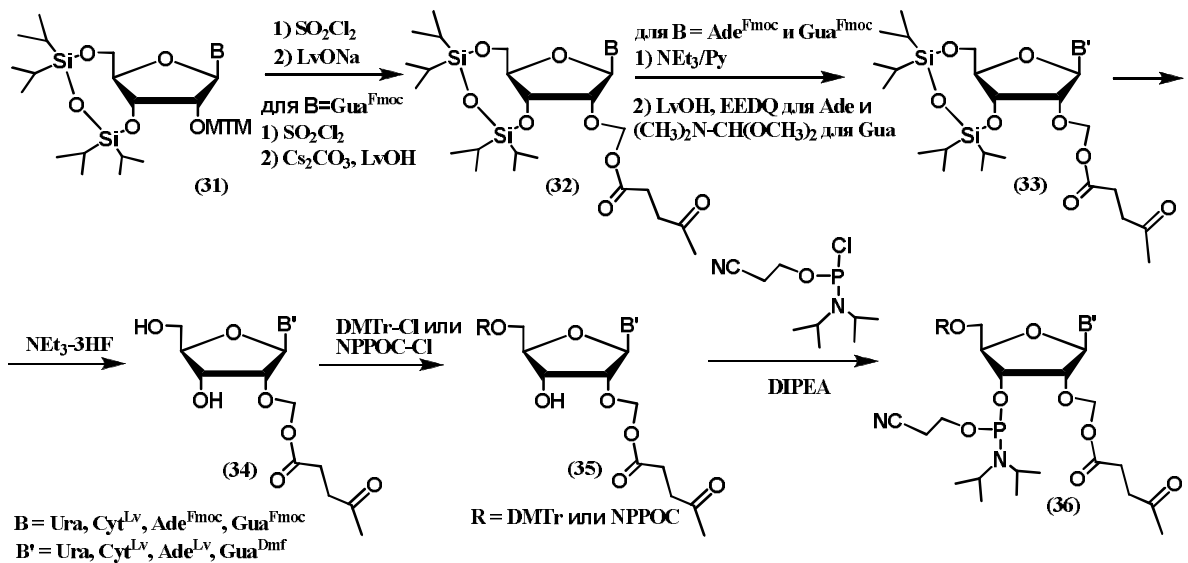


Схема 3. Получение 2'-O-ALE-амидофосфитных мономеров.

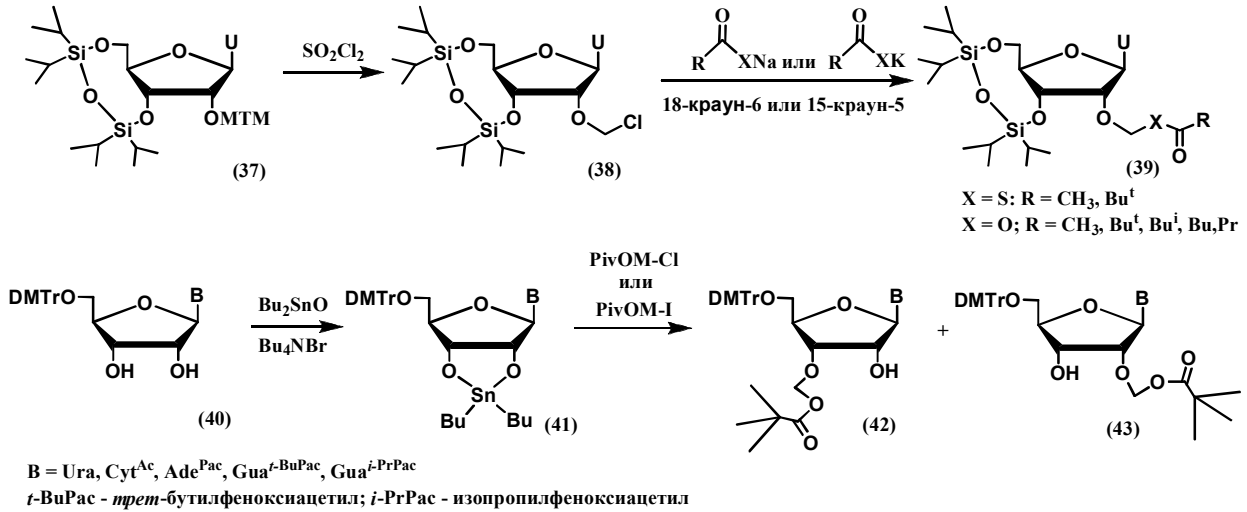


Схема 4. Введение ацилоксиметильных групп по 2'-ОН функции нуклеозидных производных.

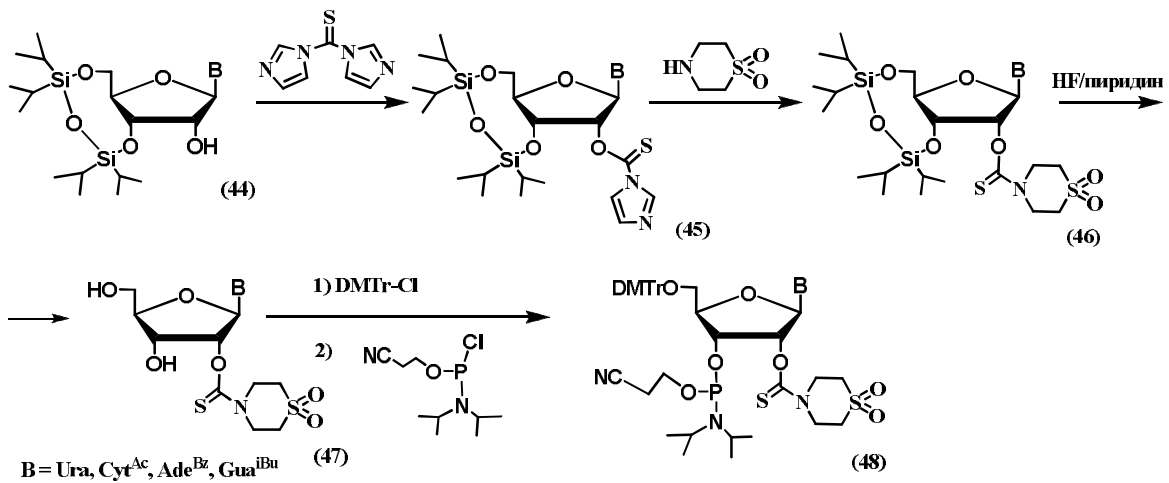


Схема 5. Получение 2'-О- тиоморфолин-1,1-диоксидтионокарбамоилфосфитных мономеров.

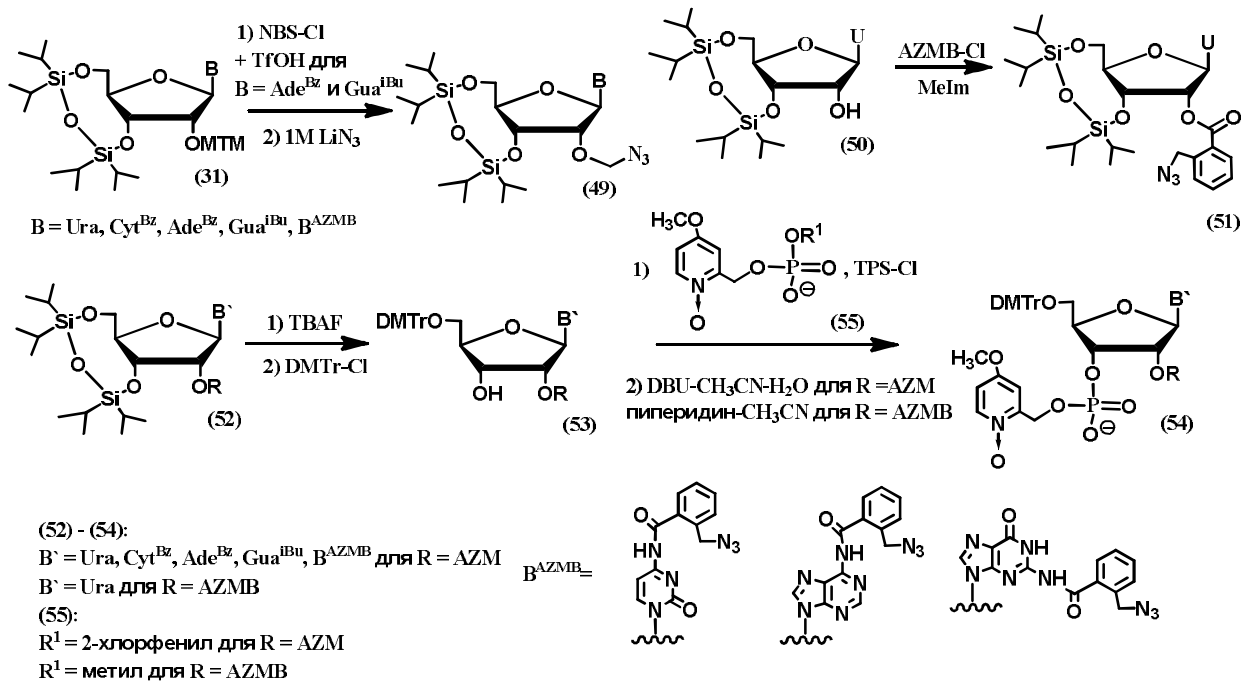
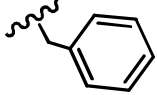
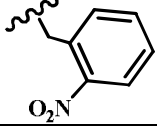
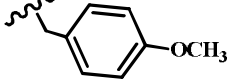
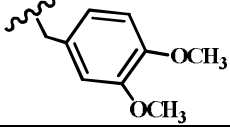
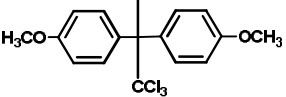
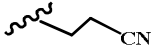
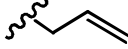
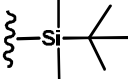
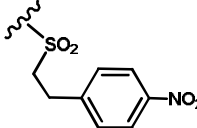


Схема 6. Получение 2'-O-AZM- и -AZMB-мономеров для быстрого фосфотриэфирного метода синтеза фрагментов РНК.

Таблица 1. Защитные группы эфирного, силильного и сульфонильного типа

Тип связи	Название группы (аббревиатура)	Структура	Способ удаления	Метод синтеза*	Литература
Эфирный	Бензил (Bn или Bzl)		Каталитическое гидрирование	а (р), б (р)	36, 37
	2-Нитробензил (Bn(NO ₂))		УФ-облучение (λ > 280 нм)	б (р)	38-40
	4-Метоксибензил (Bn(OMe))		Трифенилметил-тетрафторборат	б (р)	41, 42
	3,4-Диметоксибензил (Bn(OMe) ₂)		2,3-Дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ)	б (р)	43
	1,1-Дианизил-2,2,2-трихлорэтил (DATE)		Фталоцианиновая смешанная соль лития и кобальта (+1) и 0.5M фенол	в (т)	44
	Цианэтил (CE или CNEt)		TBAF + <i>n</i> -PrNH ₂	в (т)	45
	Аллил (All)		Рутениевый катализатор	в (р)	46
Силильный	<i>трет</i> -Бутилдиметилсилил (TBDMS)		TBAF, Et ₃ N·3HF, KF, NH ₄ F	в (т), г (т)	47-61
Сульфонильный	2-(4-Нитрофенил)-этилсульфонил (Npes)		DBU	в (р)	62-63

*а-фосфодизфирный, б – фосфотриэфирный, в – амидофосфитный, г – Н-фосфонатный; (р) – в растворе, (т) – твердофазный.

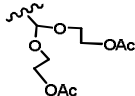
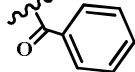
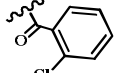
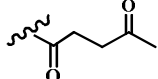
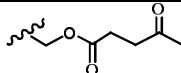
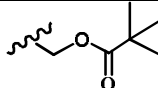
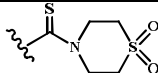

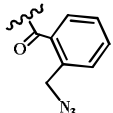
Таблица 2. Защитные группы ацетального типа

Тип связи	Название группы (аббревиатура)	Структура	Способ удаления	Метод синтеза*	Литература
Ацетальный	Тetraгидропиран-2-ил (Thp)		0.01M HCl	а (p), б (p), в (т), г (т)	51, 65-67, 76, 78
	4-Метокситетрагидропиран-4-ил (Mthp)			б (p), в (т)	21, 68-73, 77, 80
	Тetraгидрофуран-2-ил (Thf)			б (т), в (т)	74, 75, 79
	1-(2-Хлор-4-метилфенил)-4-метоксипиперидин-4-ил (Ctmp)			в (т), г (т)	51, 81-83
	1-(2-Фторфенил)-4-метоксипиперидин-4-ил (Ftmp)		0.01M HCl или 0.5M ацетатный буфер (pH 3.25)	в (т), г (т)	22, 51, 64, 84-89
	1-(4-Хлорфенил)-4-этоксипиперидин-4-ил (Crep)		0.5 M формиатный буфер, диметилацетамид (4:6, pH 2.5, 40°C)	в (т)	90, 91
	1,5-Диметоксикарбонил-3-метоксипентан-3-ил (Mdmp)		водный аммиак, затем уксусная кислота/вода (4:1, v/v)	б (p)	92
	1-{{4-{{2-(4-1-{{4-{{2-(4-Нитрофенил)этокси}карбонил}окси}бензил}окси}этил (Nebe) 1-{{3-фтор-4-{{2-(4-Нитрофенил)этокси}карбонил}окси}бензил}окси}этил (Fnebe)	 nebe: R = H fnebe R = F	DBU, затем уксусная кислота (1-3%)	в (т)	95
2,6-(Диметоксикарбонил)феноксиметил		0.2 M NaOH, затем 0.01 M HCl (pH 1 - 2)	в (т)	93	
(2-Цианоэтокси)этил (CEE)		TBAF	в (p)	96	

(<i>o</i> -Нитробензилокси)метил (2-NBOM)		облучение УФ-светом в 50% водном <i>трет</i> -бутаноле (pH 3.7)	В (т)	97
(<i>n</i> -Нитробензилокси)метил (4-NBOM)		ТВАФ	В (т)	98
		0.1 М TiCl ₃ , затем 0.1 М AcOH (pH 3.8, 90°C)	В (т)	99
4-(<i>N</i> -Дихлорацетил- <i>N</i> -метиламино)бензилоксиметил (4-DCA-MAВOM)		Водный аммонолиз, затем 0.1 М AcOH (pH 3.8, 90°C)	В (т)	99, 100
4-(Диметиламино)бензилокси]метил (4-DABOM)		0.1 М AcOH (pH 3.8, 90°C)	В (т)	99
2-(Триметилсилил)этоксиметил (SEM)		BF ₃ ·Et ₂ O или ТВАФ	В (т)	101, 102
(Триизопропилсилилокси)метил (ТОМ)		ТВАФ·3H ₂ O или Et ₄ NF·2H ₂ O	В (т)	103
(2-Цианоэтоксид)метил (СЕМ)		ТВАФ + <i>n</i> -PrNH ₂ или бис(2-меркаптоэтиловый) эфир	В (т)	104, 105
<i>пара</i> -Толилсульфонилэтоксиметил (ТЕМ)		ТВАФ + <i>n</i> -PrNH ₂ или бис(2-меркаптоэтиловый) эфир или морфолин	В (т)	106
<i>трет</i> -Бутилдитиометил (DTM)		1,4-дитиотреитол или трис(2-карбоксиэтил)-фосфин (ТСЕР) (pH 7.6)	В (т)	107
Биотинилированная фотоотщепляемая группа		облучение УФ-светом ($\lambda > 300$ нм)	В (т)	108

* - а – фосфодиэфирный, б – фосфотриэфирный, в – амидофосфитный, г – Н-фосфонатный; (р) – в растворе, (т) – твердофазный.

Таблица 3. Защитные группы ортоэфирного, сложноэфирного, ацетальэфирного, тионокарбаматного типа и азидосодержащие группы.

Тип связи	Название группы (аббревиатура)	Структура	Способ удаления	Метод синтеза *	Литература
Ортоэфирный	Бис(2-ацетоксиэтокси)метил (ACE)		Водный аммонолиз, затем 150 мМ ацетат натрия (pH 3,0, 55°C) и 300 мМ Трис-НСl (pH 8,7)	в (т)	110-113
Сложноэфирный	Бензоил (Bz)		Этанольный CH ₃ NH ₂ (33%) или <i>n</i> -BuNH ₂ -метанол-диоксан (1:1:2)	а (р), в (т)	115, 116
	2-Хлорбензоил (Bz(Cl))		Водный аммонолиз	г (т)	51, 117
	Левулинил (Lev)		0.5М гидразингидрат в смеси пиридин/уксусная кислота (3:2), 25°C	в (т)	118
Ацетальэфирный	Левулинилloxиметил (ALE)			в (т)	119,120
	Пивалоилоксиметил (PivOM)		Водный аммонолиз	в (т)	121-127
Тионокарбаматный	Тиоморфолин-1,1-диоксидтионокарбамоил (TC)		Этилендиамин (EDA)	в (т)	128
Азидосодержащие группы	Азидометил (AZM)		Трифенилфосфин или метилдифенилфосфин	д (т)	34, 35, 130
	2-(Азидометил)бензоил (AZMB)			д (т)	35

* - а – фосфодиэфирный, б – фосфотриэфирный, в – амидофосфитный, г – Н-фосфонатный, д – быстрый фосфотриэфирный; (р) – в растворе, (т) – твердофазный.

Protection of 2'-hydroxyls in the chemical synthesis of oligoribonucleotides

A. V. Aralov, O. G. Chakhmakhcheva[#]

[#]Phone: (495) 336-59-11; fax: (495) 330-56-38; e-mail: eva@mx.ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

The review is devoted to the chemical synthesis of oligoribonucleotides and the protecting groups used. In particular the existent methods of blocking 2'-OH function in nucleotide monomers for the RNA synthesis are discussed in detail.

Keywords: *oligoribonucleotides, chemical synthesis, protecting groups, 2'-hydroxyl*