



УДК 547.963.32.057

## АВТОМАТИЧЕСКИЙ АМИДОФОСФИТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Венямина А. Г., Косолапова З. А., Левина А. С.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

В области автоматического триэфирного метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов за сравнительно короткий срок достигнуты большие успехи, однако работы по автоматизации олигорибонуклеотидного синтеза идут значительно более медленными темпами [1, 2]. В то же время в последние годы сильно возрос интерес к синтетическим олигорибонуклеотидам, что связано с развитием работ по синтезу модифицированных тРНК (например, [3]), по технологии рекомбинантных РНК [4] и с другими исследованиями. Поэтому разработка эффективной процедуры синтеза олигорибонуклеотидов является важной и актуальной задачей.

Целью данной работы был синтез 3'-О-(метилдизопропиламидо)фосфитов N-защищенных 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранилрибонуклеозидов (Ia—г) (Base-Ura (a), VzAde (б), bzCyt (в), ibGua (г)) и использование их для автоматического синтеза олигорибонуклеотидов на отечественном синтезаторе «Виктория-4М» (СКТБ СЭиАП СО АН СССР, МГУ и НИВХ СО АН СССР).

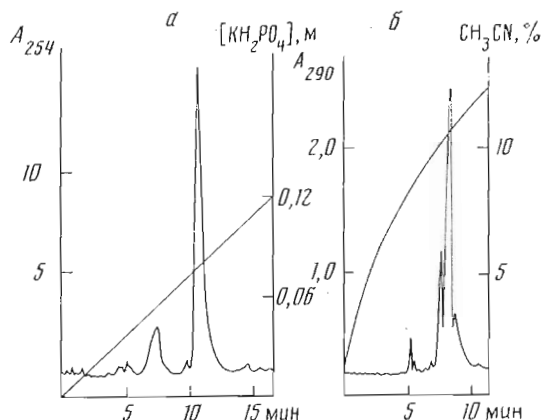
Синтез 3'-О-амидофосфитов (Ia—г) вели по аналогии с методом Карузера для дезоксирибонуклеотидных мономеров [5]. Выходы (Ia) — (Iг) составляли соответственно 94, 90, 86, 98%. <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр (CH<sub>3</sub>CN): 148,5 и 147,3 (Ia); 151,1 и 149,6 (Iб); 150,1 и 151,2 (Iв); 150,7 и 151,8 м.д. (Iг) (относительно 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

С использованием полученных дизопропиламидофосфитов рибонуклеозидов (Ia—г) и тетразола в качестве активирующего агента [2, 5] на синтезаторе «Виктория-4М» были синтезированы олигорибонуклеотиды

Цикл автоматического синтеза \*

Операция	Реагент, растворитель	Время, с
Промывка	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH (7 : 3)	20
Деблокирование	1% CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> H в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH (7 : 3)	80
Промывка	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH (7 : 3)	70
	CH <sub>3</sub> CN	60
Дозирование мономера	0,15 M (Ia—г) в CH <sub>3</sub> CN (120 мкл)	30
Дозирование тетразола	0,5 M тетразол в CH <sub>3</sub> CN (100 мкл)	24
Конденсация (циркуляция)		300
Промывка	CH <sub>3</sub> CN	20
Окисление	0,2 M I <sub>2</sub> в Py — AcOH (9 : 1)	30
Промывка	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH (7 : 3)	30
	CH <sub>3</sub> CN	20
Кэпирование	Ac <sub>2</sub> O—Et <sub>3</sub> N—MeIm—CH <sub>3</sub> CN (4,5 : 4,5 : 1 : 30)	150
Промывка	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH (7 : 3)	20
	CH <sub>3</sub> CN	20

\* Скорость протекания 2 мл/мин.



Профили ВЭЖХ реакционной смеси при синтезе GrGrArUpA: а – колонка (4,6×250 мм) с Полисил-СА [9], градиент концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0→0,3 М) в 30% ацетонитриле, скорость элюции 3 мл/мин; б – колонка (4,6×250 мм) с Lichrosorb RP-18, градиент концентрации ацетонитрила (0→20%) в 0,05 М  $\text{LiClO}_4$ , скорость элюции 2 мл/мин

GrGrArUpA и ArUpUpGrArArArUpU – аналоги участков 5–9 и 31–39 rPHK<sup>E. coli</sup>, а также гептануклеотид ArUpGrUpUpUpU. В качестве полимерного носителя использовали силикагель марки «Силохром С-120» [6]. Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена проводили согласно работам [6, 7]. Для синтеза использовали 50 мг полимера с емкостью по присоединенному нуклеозиду 60–90 мкмоль/г. Цикл присоединения одного нуклеотидного звена проводили согласно таблице. Средний выход на каждой стадии наращивания олигонуклеотидной цепи, определенный спектрофотометрически по образованию  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиона, составлял для указанных трех олигонуклеотидов 98, 96 и 85% соответственно.

Из нескольких опробованных нами условий удаления диметокситригильной группы с растущей олигонуклеотидной цепи лишь при использовании 1% толуолсульфокислоты в смеси  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$  [8] практически не затрагивалась 2'-О-тетрагидропиранильная группа. Удаление олигонуклеотидов с полимера и гидролиз защитных групп проводили стандартными методами. Выделение олигонуклеотидов проводили ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок). Гомогенность олигонуклеотидов, полученных в количестве 0,3–0,6 мг, составляла 96–99% (микроболючная ВЭЖХ). Строение олигонуклеотидов подтверждали путем гидролиза смесью фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4.1) и 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) из яда кобры с последующим анализом методом ВЭЖХ.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована возможность быстрого синтеза олигорибонуклеотидов с достаточно высокими выходами на отечественном автоматическом синтезаторе «Виктория-4М».

Авторы благодарят Н. И. Комарову за выполнение анализов, С. И. Ястребова за предоставление модифицированного полимера, а также В. П. Курмарева, В. Ф. Зарытову и В. В. Горна за участие в обсуждении результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kempe T., Chow F., Sundquist W. I., Nardi T. J., Paulson B., Peterson S. M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6695–6714.
2. Usman N., Pon R. T., Ogilvie K. K. Tetrahedron Lett., 1985, v. 26, № 38, p. 4567–4570.
3. Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. Biochemistry, 1982, v. 21, № 5, p. 855–861.
4. Miele E. A., Mills D. R., Kramer F. R. J. Mol. Biol., 1983, v. 171, № 3, p. 281–295.
5. Barone A. D., Tang J.-Y., Caruthers M. N. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 10, p. 4051–4061.
6. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920–926.
7. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Ревердатто В. С., Чахмахчева О. Г. Биоорган. хи-

мня, 1983, т. 9, № 10, с. 1367—1381.

8. Seliger H., Zeh D., Azuri G., Chattopadhyaya J. B. Chem. Scr., 1983, v. 22, p. 95—101.

9. А. с. 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.12.83 № 3670634. Опубл. в Б. И., 1985, № 17.

Поступило в редакцию  
30.VI.1986

## AUTOMATIC PHOSPHOAMIDITE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES

VENIJAMINOVA A. G., KOSOLAPOVA Z. A., LEVINA A. S.

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

Synthesis of oligoribonucleotides by the phosphoamidite method with the yields 85—98% per stage at an automatic synthesizer «Victoria-4M» is described.