



УДК 547.963.32.057

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САЛИЦИЛХЛОРОФOSФИНА ДЛЯ СИНТЕЗА  
РИБОНУКЛЕОЗИД-3'- И -5'-Н-ФОСФОНАТОВВеньямина А. Г., Ежарова Н. И., Левина А. С.,  
Ренкова М. Н.Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского  
отделения Академии наук СССР

Действием монофункционального фосфитилирующего реагента – салицилхлорфосфина – получены с высоким выходом и охарактеризованы защищенные рибонуклеозид-3'- и -5'-Н-фосфонаты – синтоны для Н-фосфонатного метода синтеза олигорибонуклеотидов. С помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии исследованы некоторые превращения промежуточного соединения – салицилнуклеозидфосфита.

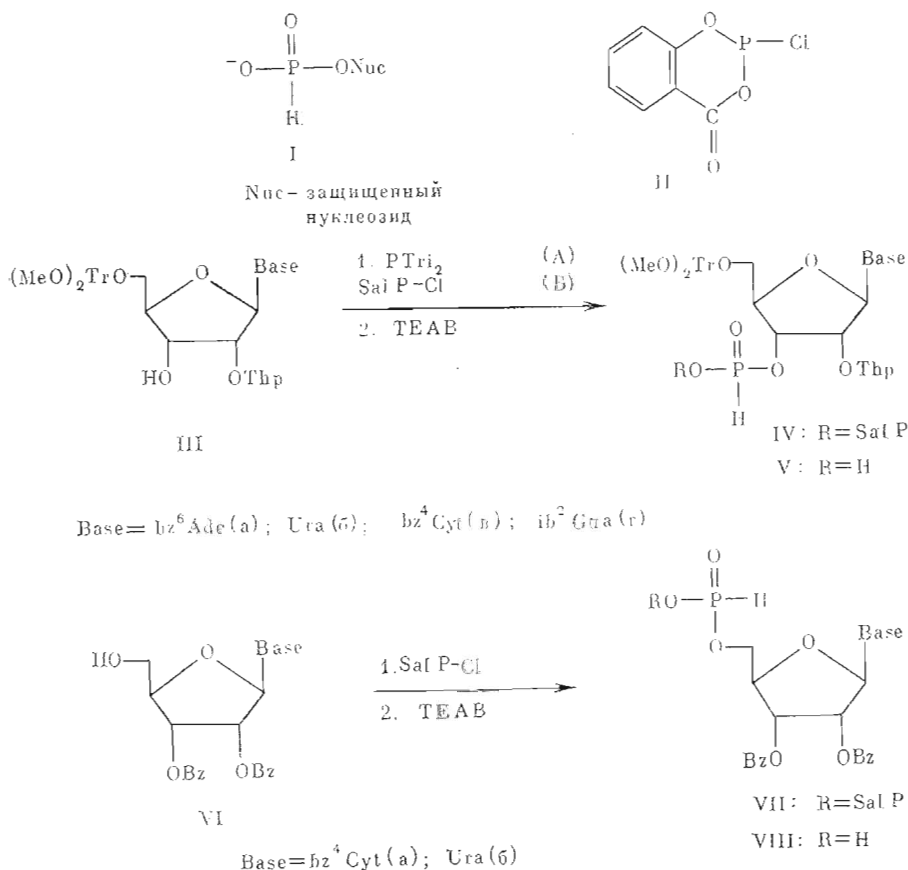
В настоящее время наиболее простым и быстрым способом получения олигонуклеотидов можно считать Н-фосфонатный метод [1–8]. В силу этого большое значение приобретает разработка эффективных методов синтеза соответствующих мономерных синтонов.

Существует целый ряд способов получения Н-фосфонатов (I) из защищенных нуклеозидов. Так, в работе Тодда с сотр. [1], где впервые была показана возможность синтеза олигонуклеотидов через Н-фосфонаты, получали 2',3'-О-изопропилиденуридин-5'-Н-фосфонат действием смешанного ангидрида бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот с последующим дебензилированием. Реакция с использованием фосфористой кислоты и арилсульфохлоридов или арилсульфамидов, описанная в 1974 г. Хатой с сотр. [9, 10], была длительной, приводила к ряду побочных продуктов [11] и была заменена авторами на модифицированный ими метод Бургады [12], заключающийся в действии на нуклеозид избытка трис(*N,N*-диметиламидо)- или -(*N,N*-диэтиламидо)фосфита в течение 24 ч с последующим гидролизом [11]. Но хотя авторы получили при этом 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-Н-фосфонат с высоким выходом, накопление сильного амина в реакционной смеси не позволяет, по их мнению, считать данный метод пригодным для синтеза нуклеозид-Н-фосфонатов с щелочеллабильными защитными группами.

Возрождение Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов [1–8], начавшееся почти через 30 лет после публикации работы Тодда [1], вновь привлекло внимание исследователей к поиску общих и экономичных методов получения этих синтонов. В 1985 г. Гарэгг и др. [2] предложили получать 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-Н-фосфонат через 2-цианэтилморфолидохлорфосфит с последующим удалением остатков морфолина и 2-цианэтанола действием соответственно 1-Н-тетразола и *n*-бутилмина. Учитывая сложность данного метода и его частный характер, эти же авторы [3, 6, 7] разработали общий способ синтеза нуклеозид-3'-Н-фосфонатов, основанный на применении трис(имидазолидо)фосфита с последующим гидролизом образующегося промежуточного производного. Почти одновременно Маттеучи и др. [5] было предложено использовать для этих целей трис(1,2,4-триазолидо)фосфит  $\text{PTri}_3$ . Необходимо отметить, что кроме работы Тодда [1] лишь в одном случае [7] был описан синтез нуклеозид-3'-Н-фосфонатов риборядка.

Сокращения: *ib* – изобутирил; *Pu* – пиридин; *Tri* – остаток 1,2,4-триазола, *SalP-Cl* – салицилхлорфосфин, *TEAB* – триэтиламмонийбикарбонат, *Thr* – тетрагидропиранил.

В поисках эффективного метода синтеза рибонуклеозид-Н-фосфонатов с целью их последующего применения для автоматического синтеза олигорибонуклеотидов [8] мы вначале остановились на методе Маттеучи [5] и по аналогии с получением 3'-Н-фосфонатов дезоксириборяда синтезировали не описанные ранее 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил-N-ацилнуклеозид-3'-Н-фосфонаты (Va-r) (схема).



Как показал анализ, полученные препараты содержали заметное количество примесей ненуклеотидного характера. Дополнительная экстракция, как это было рекомендовано в работе [5], приводила к препаратам с выходом не более 60%. Возможность образования димеров, большой расход триазола и N-метилморфолина, необходимость двойной экстракции и сравнительно низкие выходы чистых препаратов являлись недостатками данного метода.

В связи с этим наше внимание привлекла работа ван Бума [13] по использованию монофункциональных фосфитилирующих реагентов бис-(диалкиламидо)хлорфосфитов и салицилхлорфосфина (II) для синтеза дезоксирибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов; по сравнению с трехстадийным синтезом с применением бис-(диалкиламидо)хлорфосфитов особенно привлекательным казался путь с использованием реагента (II) [14].

При добавлении небольшого избытка (1.25 экв.) раствора салицилхлорфосфина (II) в диоксане (<sup>31</sup>P-ЯМР, δ 143 м.д.) к раствору защищенного нуклеозида (IIIa-г или VIa, б) в смеси диоксана и N-метилморфолина (3:1) в <sup>31</sup>P-ЯМР-спектре наблюдались два сигнала в области 120 м.д. (δ 122,5 и 123 м.д. для (IVa)), что согласовывалось с литературными данными [13] для дезоксирибонуклеозид-3'-салицилфосфитов. По данным ТСХ, при этом отмечалось исчезновение нуклеозида (5-10 мин) и появление продукта с нулевой подвижностью. Разложение реакционной смеси 1 М ТЕАВ приводило в <sup>31</sup>P-ЯМР-спектре к быстрому исчезновению

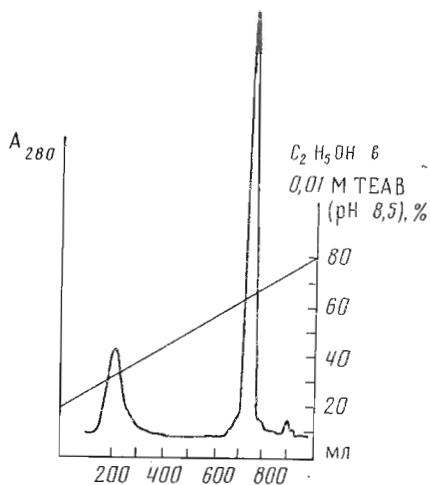


Рис. 1

Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматография нуклеозид-3'-Н-фосфоната (Vв) на Silasorb C-18 (15 мкм); объем элюента 1 л, скорость элюции 500 мл/ч

Рис. 2. МКХ на Nucleosil C-18 (60→80% MeOH в 0,02 М трис-ацетате, pH 8,0) нуклеозид-3'-Н-фосфоната (Vв) (а) и нуклеозид-5'-Н-фосфоната (VIIIб) (б)

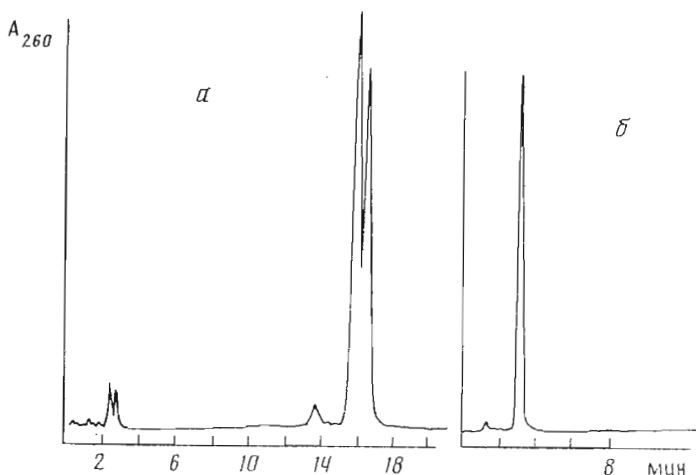


Рис. 2

сигналов соединения (IV) и появлению сигналов нуклеозид-Н-фосфонатов в области 2 м.д. ( $\delta$  2,2 м.д. для (Va)).

Полученный раствор без дополнительной обработки подвергали обращенно-фазовой хроматографии (рис. 1). При этом происходило полное отделение целевого вещества от солей и продуктов гидролиза салицилхлорфосфина. Последующее упаривание с добавлением абс. ацетонитрила позволило получить в твердом виде триэтиламмониевые соли рибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов (Va—г) и рибонуклеозид-5'-Н-фосфонатов (VIIIа, б) (см. таблицу). Их УФ-спектральные характеристики не отличались от характеристик исходных защищенных нуклеозидов.  $^{31}\text{P}$ -Химические сдвиги нуклеозид-Н-фосфонатов зависели от растворителя и противопона и менялись в пределах 0,5–2 м.д. Хроматографическая чистота препаратов, как было показано с помощью обращенно-фазовой МКХ в подобранных условиях [15], составляла 90–95% (рис. 2а, б и таблица); в некоторых случаях при этом происходило четкое разделение диастереомеров (из-за наличия хирального центра в 2'-О-тетрагидропиранильной группе) (рис. 2а).

Таким образом, использование монофункционального фосфитилирующего агента — салицилхлорфосфина (II) — в сочетании с препаративной обращенно-фазовой хроматографией среднего давления позволяет быстро получать в почти нейтральных условиях защищенные рибонуклеозид-3'- и -5'-Н-фосфонаты с высокими выходами и высокой степенью чистоты.

Выходы и характеристики синтезированных рибонуклеозид-3'- и -5'-Н-фосфоноатов

Соединение	Выход, %	эп.-ЯМР*, δ, м. д.	ТСХ, R <sub>f</sub> в системе		МКХ						УФ-спектр (этанол), нм		
			В	В	время упер- живания, мин	250		280		290		λ <sub>max</sub>	λ <sub>min</sub>
						200	260	260	260	260	260		
(Va)	93	2,2	0,30	0,58	12,6, 13,2	1,42, 1,43	1,30, 1,31	1,58, 1,61	1,12, 1,16	0,46, 0,49	280	257	
(Vб)	89	2,2	0,38	0,61	9,8	1,09	0,89	0,49	0,07	0,002	264	255	
(Vв)	91	2,2	0,30	0,59	16,2, 16,8	0,93, 0,96	0,83, 0,8	0,49, 0,48	0,36, 0,38	0,40, 0,45	262, 305	250, 290	
(Vг)	92	0,83	0,30	0,62	10,8	1,05	0,81	0,77	0,58	0,32	250-260 (плечо), 283	272	
(VIIIa)	93	-	0,32	0,58	7,7	0,90	0,84	0,51	0,38	0,40	264, 310	250, 290	
(VIIIб)	85	-	0,32	0,56	3,3	1,23	0,77	0,34	0,05	0	260	250	

\* Для (Va-г) J<sub>P</sub>-H-610 Гц.

Использование салицилхлорфосфина (II) может представлять интерес не только для синтеза мономерных сиптонов. Недавно\* нами было показано, что этот реагент можно с успехом применять и для получения концевоего 5'-Н-фосфоната олигонуклеотида, связанного с полимерным носителем. В настоящее время исследуются реакции салицилнуклеозидфосфитов типа (IV) или (VII) с различными нуклеофилами — спиртами, нуклеозидами, аминами — с целью синтеза различных производных моно- и олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали смеси диастереомеров 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранильных производных N<sup>2</sup>-бензоиладенозина, N<sup>4</sup>-бензоилцитидина, N<sup>2</sup>-изобутирилгуанозина и один из диастереомеров (менее подвижный при ТСХ) 5'-О-диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранидуридина (лаборатория технологии биохимических процессов, НИБХ СО АН СССР) [16], N<sup>4</sup>,O<sup>2'</sup>,O<sup>3'</sup>-трибензоилцитидин (НИС НГУ) [17], O<sup>2'</sup>,O<sup>3'</sup>-добензуридин (НИС НГУ) [18]. Абсолютные растворители готовили стандартными методами. Салицилхлорфосфин получали осторожным нагреванием салициловой кислоты с PCl<sub>3</sub> и последующей перегонкой [14], т. кип. 127° С/11 мм рт. ст., хранили в атмосфере аргона.

Рибонуклеозид-Н-фосфонаты выделяли обращенно-фазовой хроматографией среднего давления (стальная колонка, 30×350 мм, Silasorb C-18 (15 мкм, Chemapol, ЧССР), насос МР-50 (СКВ АН ЭССР)). Анализ и идентификацию веществ проводили с помощью ТСХ на DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системах растворителей (по объему) этанол — хлороформ, 1:9 (А), этанол — хлороформ — триэтиламин, 4:5,9:0,1 (Б) и на DC-Fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub> s (Merck, ФРГ) в системе этанол — этилацетат, 85:15 (В) [13]. Микроколоночную хроматографию проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милхром» отечественного производства на сорбенте Nucleosil C-18 (5 мкм, Macherey-Nagel, ФРГ, стальная колонка 2×62 мм) в градиенте концентрации метанола (60–80%) в 0,02 М трис-ацетате, рН 8,0, со скоростью потока 100 мкл/мин. Для получения хроматографических данных в режиме детекции на шести длинах волн со спектрофотометрического детектора хроматографа «Милхром» использовали систему сбора и обработки данных на базе микро-ЭВМ «Электроника 60 М», разработанную в НИБХ СО АН СССР [15].

Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 (Brucker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц, химические сдвиги (м.д.) приведены относительно 85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> как внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия <sup>31</sup>P-<sup>{1</sup>H} и без него. Диаметр ампулы 10 мм. Использовались 0,1 М растворы исследуемых веществ в смеси Р<sub>у</sub> — MeCN, 1:1. Реакции проводили в атмосфере аргона. Для окисления использовали свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в смеси Р<sub>у</sub> — Н<sub>2</sub>О (98:2).

*Синтез рибонуклеозид-3'- и -5'-Н-фосфонатов.* А. К охлажденному раствору РТг<sub>3</sub> (получен из 5 экв. PCl<sub>3</sub> и 16 экв. триазола в присутствии 60 экв. N-метилморфолина в абс. хлористом метиле) был добавлен по каплям (во избежание образования димеров) раствор защищенного нуклеозида (IIIa–г) (1 экв.) в хлористом метиле, содержащем 1% N-метилморфолина (контроль — ТСХ, система А). После разложения реакционной смеси 1 М раствором ТЕАВ, экстракции хлороформом и хроматографии на силикагеле (2% Et<sub>3</sub>N в СНCl<sub>3</sub> → 2% Et<sub>3</sub>N в С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН) были получены защищенные рибонуклеозид-3'-Н-фосфонаты (Va–г).

Б. К раствору защищенного нуклеозида (IIIa–г) или (VIa, б) (1 ммоль) в смеси 3 мл диоксана и 1 мл N-метилморфолина добавляли 1 мл 1,25 М раствора салицилхлорфосфина (II) в диоксане, при этом выпадал белый осадок N-метилморфолинийхлорида. Через 5–10 мин (ТСХ, система А) к реакционной смеси добавляли 2 мл 1 М ТЕАВ (рН 8,5) (ТСХ, системы Б, В) и полученный раствор наносили на Silasorb C-18 (15 мкм, стальная колонка объемом 200 мл). Элюировали линейным градиентом концентрации этанола (20–80%, 1 л, 500 мл/ч) в 0,01 М ТЕАВ (рН 8,5). Объединенные фракции упаривали с многократным добавлением абс. ацетонитрила до твердого состояния. В случае соединений (Vб, в) проводили дополнительное осаждение эфиром из ацетонитрила. Выходы и характеристики нуклеозид-Н-фосфонатов (Va–г) и (VIIIa, б) приведены в таблице.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hall R. H., Todd A., Webb R. F. // J. Chem. Soc. 1957. № 7. P. 3291–3296.
2. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. Scr. 1985. V. 25. № 3. P. 280–282.
3. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. Scr. 1986. V. 26. № 1. P. 59–62.

\* Статья Башук О. С., Зарытовой В. Ф., Левинной А. С. будет опубликована в одном из ближайших номеров журнала «Биоорганическая химия».

4. Froehler B. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469-472.
5. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5399-5407.
6. Garegg P. J., Lindh J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 34. P. 4051-4054.
7. Garegg P. J., Lindh J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // *Tetrahedron Lett.*, 1986. V. 27. № 34. P. 4055-4058.
8. Веньяминова А. Г., Левина А. С., Косолапова З. А., Репкова М. Н. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 11. С. 1588-1590.
9. Hata T., Sekine M. // *Tetrahedron Lett.* 1974. V. 15. № 45. P. 3943-3946.
10. Sekine M., Hata T. // *Tetrahedron Lett.* 1975. V. 16. № 21. P. 1711-1714.
11. Sekine M., Mori H., Hata T. // *Tetrahedron Lett.* 1979. V. 20. № 13. P. 1145-1148.
12. Burgada R., Martin C., Mavel G. // *Bull. Soc. chim. France.* 1963. № 10. P. 2154-2158.
13. Marugg J. E., Tromp M., Kuyt-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 23. P. 2661-2664.
14. Anschütz R., Emery W. O. // *Liebigs Ann. Chem.* 1987. V. 239. № 3. P. 301-313.
15. Baram G. J., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Y. A., Kuzmin S. V., Kurgaltsev V. V., Kuper E. A. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 264. № 1. P. 69-90.
16. Markiewicz W. T., Biala E., Kierzek R. // *Bull. Acad. pol. sci. Sér. sci. chim.* 1984. V. 32. № 11-12. P. 432-449.
17. Rammler D. H., Khorana H. G. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. V. 84. № 17. P. 3112-3122.
18. Lohrmann R., Khorana H. G. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. V. 86. № 19. P. 4188-4194.

Поступила в редакцию  
28.VII.1987

#### SYNTHESIS OF RIBONUCLEOSIDE-3'- AND -5'-H-PHOSPHONATES VIA SALICYLCHLOROPHOSPHINE

VENIJAMINOVA A. G., KOMAROVA N. I., LEVINA A. S., REPKOVA M. N.

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

Synthons for the H-phosphonate method of the oligoribonucleotide synthesis, 5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-tetrahydropyranyl-N-acylribonucleoside 3'-H-phosphonates and N,2',3'-O-triacylribonucleoside 5'-H-phosphonates, were prepared with high yield and purity by using a monofunctional phosphitylating reagent, salicylchlorophosphine, and reverse-phase chromatography. The substances were characterised by UV and <sup>31</sup>P-NMR spectra, TLC and reverse-phase microcolumn liquid chromatography.