



УДК 547.963.32.057

© 1992 г.

*Э. Рознерс, А. Рекис, Э. Виздена***СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ
МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЩЕЛОЧНОЛАБИЛЬНЫХ
2'-О-ЗАЩИТНЫХ ГРУПП****III *. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ 2' → 3'-МИГРАЦИИ
АРОИЛЬНЫХ ГРУПП***Рижский технический университет*

Методом ВЭЖХ исследована кинетика 2'→3'-изомеризации N-ацил-5'-О-третил-2'-О-ароилнуклеозидов — bzC, bzA, ibG и U с различными 5'-третильными (MeOTr, (MeO)₂Tr, Me₃Tr) и 2'-О-ароильными защитными группами. Данные для сравнения скоростей изомеризации представлены в виде кривых и коэффициентов эмпирического уравнения, описывающего эти кривые.

Общей закономерности между структурой защищенных нуклеозидов и скоростью 2'→3'-миграции ароильных групп установить не удалось. Обнаружен ряд соединений, обладающих достаточно низкой скоростью изомеризации и пригодных для их использования в олигонуклеотидном синтезе.

Применение щелочнолабильных 2'-О-ароильных защитных групп в олигорибонуклеотидном синтезе требует решения трех основных задач: достижения высокой селективности бензоилирования, сведения к минимуму опасности 2'→3'-миграции бензоильной группы на стадии синтеза мономерных синтонов, предотвращения возможной деградации олигонуклеотида во время конечной стадии деблокирования в щелочной среде.

Основываясь на методе Кемпе и соотр. [2], мы достигли высокой селективности 2'-О-бензоилирования N-ацил-5'-О-третилрибонуклеозидов [1]. В работе [1] нами были представлены также некоторые данные о скорости миграции бензоильной и анизоильной групп и на их основе сделан вывод о некотором преимуществе анизоильной группы. Полученные предварительные данные побудили нас провести систематические исследования влияния структурных факторов на скорость 2'→3'-изомеризации.

Мы ставили перед собой, во-первых, чисто практическую задачу — получение ряда N-ацил-2'-О-бензоил-5'-О-третилнуклеозидов с достаточно низкой скоростью 2'→3'-изомеризации и удовлетворяющих требованиям олигонуклеотидного синтеза.

Во-вторых, мы надеялись, опираясь на достаточно широкий экспериментальный материал, обнаружить закономерности зависимости скорости миграции 2'-О-ароильных групп как от характера заместителей в 2'-ароильной и 5'-третильной группах, так и от природы гетероциклического основания, что позволило бы предвидеть влияние этих факторов на скорость 2'→3'-изомеризации и сделать определенные выводы.

Синтез N-ацил-2'-О-ароил-5'-О-третилнуклеозидов проводили согласно работе [1] селективным бензоилированием N-ацил-5'-О-третилнуклеозидов соответствующим ароилхлоридом при —78°С в растворе метиленхло-

* Сообщение II см. [1]. Аббревиатура нуклеозидов дана в соответствии с правилами IUPAC—IUB; в скобках справа от символа нуклеозида — заместитель по 2'-ОН-группе, дрс — дифенилкарбамоил.

Данные ¹H-ЯМР-спектров * (δ, м.д.) N-ацил-2'-O-ароил-5'-O-триэтилрибонуклеозидов (CDCl₃, внутренний стандарт — ТМС)

Нуклеозид **	H1' (д, 1H)	H2' (т, 1H)	H3' (т, 1H)	H4' (м, 1H)	H5' (д, 2H)	—OCH ₃ (с)	Ароматические протоны	—NH	Другие протоны
1	5,83	4,20	4,43	4,11	3,47	3,71 (3H)	6,67; 7,18—7,38 (14H)		H5 — 5,28, H6 — 7,91
2	6,24	5,62	4,73	4,18	3,53	3,78 (3H)	6,70; 7,08—7,44; 7,94 (18H)	8,40	H5 — 5,40, H6 — 7,70
3	6,24	5,57	4,73	4,16	3,53	3,78 (3H)	6,70; 7,07—7,37; 7,92 (18H)	8,60	H5 — 5,36, H6 — 7,77, CH ₃ — 2,55
4	6,22	5,52	4,66	4,14	3,53	3,78 (6H)	6,75; 7,02—7,40; 7,85 (17H)	8,82	H5 — 5,33, H6 — 7,73, CH ₃ — 2,55
5	6,22	5,52	4,68	4,15	3,50	3,78 (6H)	6,72; 7,04—7,30; 7,86 (18H)	8,50	H ₅ — 5,30, H ₆ — 7,72, CH ₃ — 2,34
6	6,0	4,30—4,40 ***	4,84	4,30—4,40	3,30	3,71 (3H)	6,73; 7,0—7,52; 6,73 (19H)	9,0	H2 — 8,18, H8 — 8,67
7	6,32	6,06	4,94	4,24	3,47	3,71 (3H)	6,77; 7,12—7,50; 7,78; 7,92 (20H)	9,04	H2 — 8,18, H8 — 8,67
8	6,33	5,99	4,92	4,23	3,45	3,71 (3H)	6,77; 7,17—7,49; 9,07 (20H)	9,07	H2 — 8,08, H8 — 8,67, CH ₃ — 2,47
9	6,31	6,05	4,93	4,26	3,46	3,70 (6H)	6,71; 7,09—7,44; 7,73; 7,90 (22H)	8,98	H2 — 8,07, H8 — 8,61

* ЯМР-спектры получены на приборе WH-90/DS (Bruker, ФРГ), рабочая частота 90 МГц.

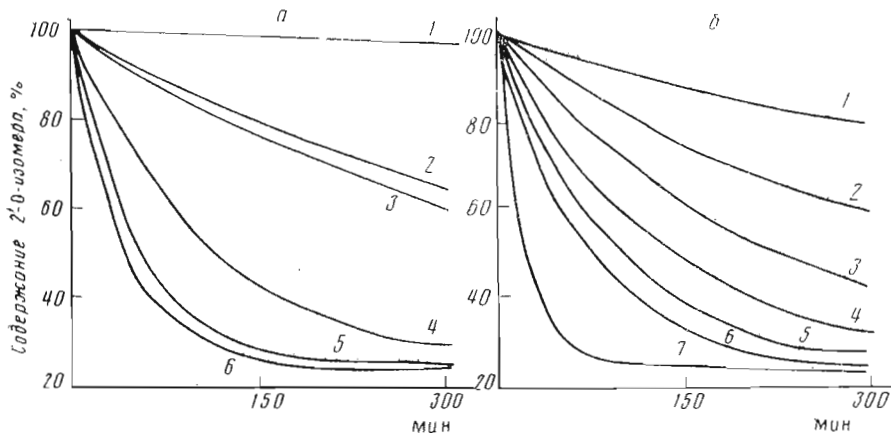
** 1 — (MeOTr)U, 2 — (MeOTr)U(2-ClBr), 3 — (MeOTr)U(2-MeBz), 4 — ((MeO)₂Tr)U(2-MeBz), 5 — ((MeO)₂Tr)U(4-MeBz), 6 — (MeOTr)bzA, 7 — (MeOTr)bzA(2-ClBz), 8 — (MeOTr)bzA(2-MeBz), 9 — ((MeO)₂Tr)bzA(2-ClBz). с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет. КССВ: J_{1',2'} = J_{2',3'} = J_{3',4'} = J_{4',5'} = 5 Гц; для 1—5 J_{5,6} = 8 Гц.

*** Вид сигнала — мультиплет.

ряда в присутствии цитидина. Продукт реакции выделяли осаждением петролейным эфиром и после высушивания подвергали анализу.

Для защиты 5'-ОН-функции применяли метокситритильную (MeOTr-), диметокситритильную ((MeO)₂Tr-) и триметилтритильную (Me₃Tr-) группы, в качестве 2'-O-защиты исследовали ряд замещенных бензоильных групп. Синтезировано около 20 производных каждого нуклеозида. Данные ¹H-ЯМР-спектров некоторых защищенных нуклеозидов представлены в табл. 1.

Исследование кинетики миграции 2'-O-ароильных групп проводили методом ВЭЖХ согласно работе [1]. Готовили 10⁻⁵—10⁻⁶ М растворы защищенных нуклеозидов в CH₃OH—H₂O (87:13) при 24°С и периодически проводили обращенно-фазовый хроматографический анализ раствора. Частота измерений была подобрана для каждого соединения индивидуально с учетом данных предварительных экспериментов, таким образом, чтобы до установления равновесного состояния получить достаточное количество результатов (в среднем 8) для построения кривых. Выбор системы CH₃OH—H₂O (87:13) в качестве растворителя обусловлен двумя причинами: 1) в нем достаточно быстро протекает 2' → 3'-изомеризация бензоилнуклеозидов, 2) он служит хорошим хроматографическим элюентом.



Изменение концентрации 2'-О-ароилнуклеозидов в растворе $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (87:13) при 24° С. Хроматограф «Милихром», колонка Силасорб С-18, 5 мкм (64×2 мм), элюент — $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (87:13), скорость потока 50 мкл/мин. а) 1 — $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzC} \cdot (2\text{-ClBz})$, 2 — $(\text{Me}_3\text{Tr})\text{bzC}(2\text{-MeBz})$, 3 — $(\text{MeOTr})\text{bzC}(2\text{-MeBz})$, 4 — $(\text{MeOTr})\text{bzC}(2\text{-ClBz})$, 5 — $(\text{MeO})_2\text{Tr}\text{bzC}(2\text{-ClBz})$, 6 — $(\text{MeO})_2\text{Tr}\text{bzC}(2\text{-MeBz})$. б) 1 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(3,4\text{-}(\text{MeO})_2\text{Bz})$, 2 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(3,4,5\text{-}(\text{MeO})_3\text{Bz})$, 3 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(4\text{-MeBz})$, 4 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(4\text{-FBz})$, 5 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(\text{Bz})$, 6 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(4\text{-MeOBz})$, 7 — $(\text{MeOTr})\text{bzA}(4\text{-ClBz})$.

Полученные кривые (рисунок) изменения содержания 2'-О-изомера в реакционной смеси (за 100% принималась сумма 2'- и 3'-изомеров) представляют собой экспоненты, их можно описать с помощью эмпирического уравнения

$$C = 74e^{-Kt} + 25,$$

где C — содержание 2'-О-изомера (%), T — время в секундах, K — коэффициент экспоненты.

Данное уравнение хорошо описывает кинетику изомеризации 2'-О-ацилнуклеозидов; равновесная концентрация 2'-О-изомера составляет примерно 25% для всех исследованных веществ. Отклонения отдельных величин в наших экспериментах не превышали 2–3%, что не выходит за пределы погрешности хроматографического эксперимента. Полученную таким образом информацию можно компактно представить в виде коэффициентов K , хранить и обрабатывать с помощью персонального компьютера.

В табл. 2 данные представлены в порядке увеличения скорости изомеризации отдельно для производных каждого нуклеозида.

На рисунке приведены некоторые характерные кривые изомеризации, иллюстрирующие скорости 2'→3'-миграции *орто*-замещенных ароильных групп (а) и различных ароильных групп для 5'-О-монометокситритил-№6-бензоиладенозина (б).

Анализ полученных данных показывает, что во многих случаях наблюдается снижение скорости изомеризации под влиянием электронодонорных заместителей и увеличение под влиянием электроноакцепторных заместителей в ароильной группе. Снижение скорости миграции наблюдается также вследствие стерических затруднений, например в случае *орто*-замещенных ароильных групп. Однако эти тенденции имеют много исключений, поэтому мы пришли к выводу, что механизм изомеризации нельзя объяснить, учитывая только электронные и стерические эффекты. Совершенно очевидно, что на данный процесс влияют и другие факторы. Одним из них, на наш взгляд, являются межплоскостные гидрофобные

Коэффициенты экспонент K

Рибонуклеозид	Коэффициент K	Рибонуклеозид	Коэффициент K
(Me ₃ Tr) bzA (2-ClBz)	1,8 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) U (2-ClBz)	8,7 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (3,4-(MeO) ₂ Bz)	1,8 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) U (4-ClBz)	2,9 · 10 ⁻³
((MeO) ₂ Tr) bzA (4-MeOBz)	2,4 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) U (4-ClBz)	2,9 · 10 ⁻³
(MeOTr) bzA (2-MeOBz)	3,3 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) ibG (Bz)	2,8 · 10 ⁻⁶
(MeOTr) bzA (4- <i>t</i> -BuBz)	3,4 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) ib ⁴ dpc ⁶ G (4-MeOBz)	6,5 · 10 ⁻⁵
(MeOTr) bzA (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	4,4 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) ibG (2-MeBz)	7,1 · 10 ⁻⁵
(Me ₃ Tr) bzA (2-MeBz)	5,9 · 10 ⁻⁵	(Me ₃ Tr) ibG (2-MeBz)	8,8 · 10 ⁻⁵
(MeOTr) bzA (4-MeBz)	8,0 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) ib ⁴ dpc ⁶ G (4-MeOBz)	9,1 · 10 ⁻⁵
(Me ₃ Tr) bzA (4-MeOBz)	1,1 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) ibG (4-MeOBz)	1,0 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (2-MeBz)	1,3 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) ibG (2-ClBz)	1,3 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (4-FBz)	1,3 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) ibG (4-MeOBz)	1,6 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (Bz)	1,8 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) ibG (4-MeBz)	2,4 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) bzA (2-MeBz)	1,8 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) ibG (4-MeOBz)	2,8 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) bzA (3,4-(MeO) ₂ Bz)	2,2 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) ibG (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	2,9 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (4-MeOBz)	2,5 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) ibG (4-ClBz)	4,0 · 10 ⁻⁴
(Me ₃ Tr) bzA (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	2,6 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) ibG (2-ClBz)	6,3 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) bzA (4-MeBz)	2,7 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) ibG (4-ClBz)	6,8 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) bzA (2-ClBz)	2,8 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) ibG (Bz)	9,5 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) bzA (Bz)	4,0 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) ibG (Bz)	1,1 · 10 ⁻³
(Me ₃ Tr) bzA (4-MeBz)	6,2 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) ibG (2-ClBz)	1,5 · 10 ⁻³
((MeO) ₂ Tr) bzA (2-ClBz)	7,1 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) ibG (4-ClBz)	1,1 · 10 ⁻²
((MeO) ₂ Tr) bzA (4-ClBz)	7,2 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) bzC (2-ClBz)	2,3 · 10 ⁻⁷
(MeOTr) bzA (4-ClBz)	8,7 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) bzC (Bz)	3,4 · 10 ⁻⁶
((MeO) ₂ Tr) bzA (4-FBz)	9,7 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) bzC (4-MeOBz)	5,4 · 10 ⁻⁶
(Me ₃ Tr) bzA (Bz)	2,6 · 10 ⁻³	(Me ₃ Tr) bzC (2-MeBz)	3,6 · 10 ⁻⁵
(Me ₃ Tr) bzA (4-ClBz)	3,3 · 10 ⁻²	((MeO) ₂ Tr) bzC (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	3,9 · 10 ⁻⁵
(Me ₃ Tr) U (2-ClBz)	2,8 · 10 ⁻⁷	(MeOTr) bzC' (2-MeBz)	4,2 · 10 ⁻⁵
(MeOTr) U (4-MeOBz)	6,7 · 10 ⁻⁷	(Me ₃ Tr) bzC (4-MeOBz)	6,9 · 10 ⁻⁵
((MeO) ₂ Tr) U (2-MeBz)	1,1 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) bzC (Bz)	7,2 · 10 ⁻⁵
((MeO) ₂ Tr) U (4-MeBz)	2,0 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) bzC (4-MeOBz)	1,2 · 10 ⁻⁴
(Me ₃ Tr) U (Bz)	3,8 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) bzC (2-ClBz)	1,6 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) U (2-MeBz)	6,2 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) bzC (Bz)	1,7 · 10 ⁻⁴
(Me ₃ Tr) U (4-MeOBz)	7,1 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) bzC (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	2,1 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) U (Bz)	7,3 · 10 ⁻⁵	((MeO) ₂ Tr) bzC (4-MeBz)	2,8 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) U (4-MeOBz)	9,7 · 10 ⁻⁵	(MeOTr) bzC (4-ClBz)	3,4 · 10 ⁻⁴
(Me ₃ Tr) U (2-MeBz)	1,6 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) bzC (2-ClBz)	3,5 · 10 ⁻⁴
(MeOTr) U (Bz)	2,5 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) bzC (2-MeBz)	4,3 · 10 ⁻⁴
(Me ₃ Tr) U (4-ClBz)	3,3 · 10 ⁻⁴	((MeO) ₂ Tr) bzC (4-ClBz)	4,4 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) U (2-ClBz)	3,7 · 10 ⁻⁴	(Me ₃ Tr) bzC (4-ClBz)	7,4 · 10 ⁻⁴
((MeO) ₂ Tr) U (3,4,5-(MeO) ₃ Bz)	8,0 · 10 ⁻⁴	(MeOTr) bzC (4-MeBz)	1,6 · 10 ⁻³

взаимодействия, в которые одновременно вступают как тритильная и 2'-О-ароильная группы, так и гетероциклическое основание. Однако этот вопрос требует более глубоких теоретических исследований и не может обсуждаться в данной статье.

В то же время можно отметить, что ряд соединений обладает достаточно низкой скоростью изомеризации (табл. 2), поэтому может быть рекомендован для использования в олигорибонуклеотидном синтезе.

Авторы благодарны М. В. Петровой за снятие ЯМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рознерс Э. Э., Рекис А. Х., Кумпиньш В. Х., Биздена Э. О. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1531-1536.

Поступила в редакцию
27.II.1991

После доработки
31.V.1991

E. ROZNERIS, A. REKIS, E. BIZDENA

**SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE H-PHOSPHONATE
APPROACH USING BASE-LABILE 2'-O-PROTECTIVE GROUPS.
III. STUDIES ON KINETICS OF 2'-3' MIGRATION OF AROYL
GROUPS**

Technical University, Riga

Kinetics of 2'-3' isomerisation of eighty N-acyl-5'-O-triethyl-2'-O-arylnucleosides in a MeOH - H₂O (87 : 13) mixture at 24° C was investigated by means of the reverse-phase-microcolumn liquid chromatography.