



УДК 547.963.32 : 542.952.6

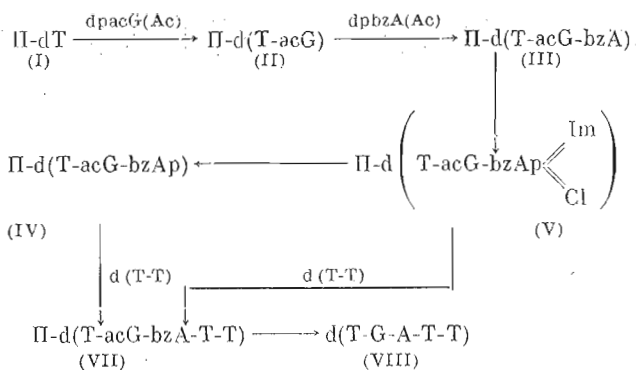
БЛОЧНЫЙ СИНТЕЗ ПЕНТАНУКЛЕОЗИДТЕТРАФОСФАТА
НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕТуманов Ю. В., Шляпников М. Г., Потанов В. К.,
Шабарова З. А.*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

На примере синтеза пентануклеозидтетрафосфата d(T-G-A-T-T) изучена возможность соединения блоков через 3'-концевую фосфатную группу олигонуклеотида, присоединенного к высокосшитому (40% дивинилбензола) макропористому полимерному носителю. Синтез блоков d(T-G-A) d(T-T) проведен твердофазным методом с выходом соответственно 63 и 90%, считая на исходный полимер-тимидин. Фосфорилирование связанного с полимером тринуклеотида осуществлено при помощи дихлорфосфоимидазолида, а дальнейшее присоединение блока d(T-T) проведено в двух вариантах: с использованием 3'-хлорфосфатной группировки в тринуклеотиде или путем конденсации при помощи триизопропилбензолсульфохлорида. Оба способа дают одинаковый выход конечного продукта (40%).

Твердофазный метод синтеза олигонуклеотидов позволяет с удовлетворительными выходами синтезировать 3—4-членные рибо- и дезоксирибо-олигонуклеотиды не только в аналитическом, но и в препаративном масштабе [1—3]. Трудности ступенчатого синтеза олигонуклеотидов большей длины связаны с двумя главными обстоятельствами — накоплением на полимере олигонуклеотида с пропусками в последовательности за счет незначительного выхода на каждой стадии и осмояющим действием конденсирующего агента. В связи с этим в ряде случаев более перспективным является блочный вариант синтеза, особенно в сочетании с мягким методом конденсации. При этом даже средний (35—40%) выход на стадии присоединения блока вполне окупается большей чистотой полученного олигонуклеотида, поскольку при ступенчатом синтезе для достижения того же результата выход на каждой стадии должен быть значительно выше, а осмояющее действие конденсирующего агента при этом увеличивается пропорционально числу стадий.

В настоящей работе проведен твердофазный синтез дезоксипентануклеозидтетрафосфата d(T-G-A-T-T) (VIII), комплементарного 3'-концевому фрагменту валиновой тРНК, с использованием на последней стадии блочного способа соединения фрагментов.

В качестве полимерного носителя (II) в работе использован высокосшитый макропористый сополимер стирола с *n*-дивинилбензолом (40%) и *n*-метокси-*n*-винилтрифенилкарбинолом (3%) (порообразователь — изоамиловый спирт) [5]; спиртовую группу в триарилметильном остатке заменяли на хлор, в результате чего создавался активный центр носителя для конденсации с нуклеозидом (тимидином). Емкость носителя, считая на присоединенный тимидин, составила ~ 0,1 ммоль (22 мг dT) на 1 г полимера. Из двух возможных вариантов синтеза — с использованием нуклеотид-



ного блока, несущего 5'-или 3'-концевую фосфатную группу, был выбран второй, поскольку в этом случае оба компонента — динуклеозидфосфат d(T-T) и полимер-3'-тринуклеотиды (IV) и (V) могут быть легко получены на одном и том же типе полимерного носителя с высоким выходом [1, 4]. При этом наличие на 3'-конце нуклеотида (V) активированной хлорфосфатной группы позволяет проводить стадию присоединения блоков как с применением конденсирующего агента, так и без него. Важно также, что в реакцию с фосфатной группой вступает более реакционноспособная 5'-гидроксильная группа нуклеозида или динуклеозидфосфата.

Исходный полимер-тринуклеозиддифосфат (III) был получен с выходом 63% ступенчатым синтезом из II-dT (I) и защищенных 5'-нуклеотидов с триизопропилбензолсульфохлоридом в качестве конденсирующего агента [3], а блок d(T-T) синтезирован с выходом 90% описанным ранее методом без применения конденсирующего агента [4].

Важнейшим этапом синтеза по приведенной выше схеме является введение активированной фосфатной группы в 3'-положение олигонуклеотидного блока на полимере. Для этой цели был использован дихлорфосфоимидозолид* — новый активный фосфорилирующий агент, практически не расщепляющий в отличие от хлорокиси фосфора межнуклеотидную связь [6]. Полученный на этой стадии полимер-тринуклеотид (V), выход которого составляет не менее 90%, использовался для изучения двух вариантов блочного синтеза. В первом случае хлорангидрид (V) непосредственно обрабатывался 10-кратным избытком блока d(T-T), во втором — сначала проводили гидролиз водой, а тринуклеотид (IV) конденсировали с тем же избытком d(T-T) в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида.

Выход пентануклеозидтетрафосфата (VIII) после снятия его с носителя и удаления защитных групп оказался равным ~ 40% в обоих случаях, считая на тринуклеотид, однако количество темноокрашенных смолистых веществ в продукте, полученном без конденсирующего агента, было значительно меньше. Микроколоночная хроматография обоих образцов (VIII) по Томлинсону-Тенеру [7] дает полностью симметричный пик выхода вещества при концентрации NaCl ~ 0,12 M, что соответствует четырем отрицательным зарядам. Строение синтезированных соединений было доказано определением соотношения продуктов гидролиза фосфодиэстераз из селезенки (КФ 3.1.4.1), которое оказалось практически одинаковым в обоих случаях (dT — dTp — dGp — dAp, 1 : 1,91; 0,85 : 0,95).

Следует отметить, что такой же выход (39%) был получен ранее при присоединении блока d(G-G) к полимер-динуклеотиду II-d(G-Gp) триэфирным методом с использованием конденсирующего агента [1]. В то же время выход d(T-T-T-T) при твердофазном синтезе путем присоединения

* Соединение не выделялось в чистом виде, а было получено непосредственно перед реакцией смешением эквимолекулярных количеств имидазола и хлорокиси фосфора в абсолютном пиридине.

блока с 5'-концевой фосфатной группой d [pT-T (Ac)] к П-d (T-T) не превышал 20% [8].

Таким образом, целесообразной схемой синтеза олигонуклеотидов является блочный синтез через 3'-концевую хлорфосфатную группу олигонуклеотида, закрепленного на полимере, поскольку как синтез исходных блоков, так и их соединение в более длинные последовательности заданного состава протекают на одном типе полимерного носителя с достаточно высокими выходами. При этом наиболее ответственная стадия сборки блоков проводится без участия конденсирующего агента, что обеспечивает высокую чистоту синтезированного полинуклеотида, который при необходимости может быть затем легко профосфорилирован по 3'-концу олигонуклеотидной цепи в мягких условиях.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеотиды, полученные на опытной установке НИОХ АН СССР, тимидин — коммерческий препарат фирмы «Reanal». Синтез d (T-T), dpac G (Ac) и dpbzA (Ac) проводили по методам, описанным в работах [4, 9, 10]. Абсолютный пиридин получали перегонкой над Tos Cl, P₂O₅ и выдерживанием 7—10 дней над молекулярными ситами 4A в колонке. БХ проводили на бумаге FN1 в системах: А — изопропанол — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2); В — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 3); С — этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3), pH 7,5. Электрофорез проводили на приборе для горизонтального электрофореза при напряжении 1000—1500 В на бумаге FN1 и FN3 в 0,05 М триэтил-аммонийбикарбонатном буфере (pH 7,5). Величину E_f вычисляли относительно dpT E_{dpT} . УФ-спектры измеряли на приборах SP-700 и SP-800 фирмы «Uniscam», ИК-спектры измеряли на приборе UR-20 («Zeiss», ГДР). Выход олигонуклеотида определяли после каждой стадии синтеза и удаления с носителя суммарного нуклеотидного материала, что достигали обработкой навески полимера (50 мг) 1%-ным раствором CF₃COOH в смеси бензол — хлористый метилен (1 : 1) при температуре —50, —60° в течение 15 мин. Полимер отмывали на фильтре бензолом (3 × 15 мл), а затем экстрагировали пиридином (3 × 5 мл), водным пиридином (3 × 5 мл) и спиртом (3 × 5 мл), объединенный пиридиновый и спиртовый растворы упаривали, удаляли пиридин отгонкой в вакууме с аммиаком и затем продукты анализировали при помощи БХ или электрофорезом на бумаге. Выходы рассчитывали по оптическим плотностям элюатов соответствующих УФ-поглощающих зон. Значения молярной экстинкции ϵ были равны: для dT — 9600 [8] и dbzA — 20 700 [9], dacG — 16 700 [10].

1. *Полимер-метокситритилхлорид (II)*. В 0,75 л 5%-ного раствора крахмала, нагретого до 65°, при перемешивании вводили 122 мл смеси, содержащей 33 мл стирола, 22 мл *n*-дивинилбензола, 27 мл *n*-декана, 31 мл изоамилового спирта, 6 мл мезитилена, 1,7 г *n*-метокси-*n*-винил-трифенилкарбинола и 0,5 г (1%) азо-бис-изобутиронитрила. Полимеризацию проводили в течение 20 ч, повышая температуру в последние 2 ч до 80—85°. Суспензию полимера выливали в 4 л горячей воды (80°) и после отстаивания отсасывали мутный раствор крахмала из-под всплывшего осадка. Операцию повторяли 3—4 раза, после чего полимер переносили на пористый фильтр и тщательно отмывали горячей водой, этиловым спиртом, бензолом и, наконец, экстрагировали 4—5 ч бензолом в аппарате Сокслета.

30 г полученного полимера обрабатывали 100 мл смеси бензол — хлористый ацетил (1 : 2) 2 ч и при кипении, затем полимер-метокситритилхлорид (II) отмывали на фильтре абс. бензолом, эфиром и высушивали в вакууме.

2. *Полимер-тимидин (I)*. Раствор 1,5 г (6,2 ммоль) высушенного при 50° в вакууме тимидина в 50 мл абс. пиридина досушивали отгонкой в вакууме 20 мл пиридина и к остатку быстро прибавляли 20 г полимер-метокси-

триглицерида. Густую суспензию перемешивали на качалке в течение ночи, нагревали 2 ч при 50° и добавляли 1 мл сухого метанола. Через 30 мин полимер отфильтровывали и промывали пиридином (4 × 20 мл), 50%-ным водным пиридином (3 × 20 мл), спиртом (4 × 20 мл) и эфиром (4 × 20 мл), после чего высушивали в вакууме. Количество присоединенного тимидина, определенное методом количественной ИК-спектроскопии, составляло 20 мг (0,08 ммоль) на 1 г полимера.

3. *II-d (T-acG) (II)*. Высушивали 9 г продукта (I) (0,75 ммоль dT) трехкратным упариванием с 15 мл абс. пиридина в вакууме и добавляли 1,5 г (3 ммоль) dracG (Ac), предварительно активированной 2,26 г (7,5 ммоль) триизопропилбензолсульфохлорида в 15 мл абс. пиридина в течение 2 ч. Смесь перемешивали на качалке в течение 15 ч и полученный II-d [T-acG × (Ac)] отфильтровывали и отмывали на фильтре пиридином (4 × 20 мл), водным пиридином (5 × 20 мл), постепенно увеличивая количество воды (от 20 до 90%), пиридином (2 × 30 мл). Выход d (T-G) — 75%, считая на присоединенный к полимеру dT. $E_{дрт}$ 0,46; R_f в системе А — 0,25.

Для удаления 3'-О-ацетильной группы II-d [T-acG (Ac)] обрабатывали смесью 1 н. раствор CH_3ONa в метаноле — пиридин (1 : 1) в течение 1 ч при 20°. Полимер тщательно отмывали на фильтре смесью пиридин — метанол (1 : 1) (5 × 30 мл), водным пиридином (5 × 30 мл) и метанолом, после чего экстрагировали пиридином в течение ночи.

4. *II-d(T-acG-bzA) (III)* проводили по методике, описанной в опыте 3. В реакцию вводили: 6 г (II) [0,38 ммоль d (T-G)], 1,1 г drpbzA (Ac) (2 ммоль), 1,51 г триизопропилбензолсульфохлорида (5 ммоль). Выход d (T-G-A) 85%, считая на d (T-G), или 63%, считая на исходный тимидин, $E_{дрт}$ 0,71, $R_{фт}$ в системе А — 0,6; в системе С — 0,79. Гидролиз хроматографически чистого соединения фосфодиэстеразой змеиного яда (КФ 3.1.4.1) дал соотношение T — pG — pA, 1 : 0,94 : 0,97.

5. *d (T-G-A-T-T) (VIII)*. а) В реактор с фильтром и охлаждающей рубашкой помещали 200 мг полимер-тринуклеотида (III) [10 мкмоль (T-G-A)], при температуре +4° и перемешивании прибавляли охлажденный раствор смеси эквимольных количеств хлорокиси фосфора (765 мг, 5 ммоль) и имидазола (340 мг, 5 ммоль) в 5 мл абс. пиридина. Выпавший при смешении реагентов осадок отделяли фильтрованием. Перемешивание продолжали 5 мин и полимер-тринуклеотидхлоримидазол (V) отмывали от избытка фосфорилирующего агента абс. пиридином (4 × 5 мл).

б) Гидролиз хлорангидрида (V) проводили обработкой полимера водным пиридином (30—40% воды). Выход полимер-тринуклеотида (IV), определенный после удаления нуклеотидного материала с части носителя — 90%, считая на исходный (III).

в) К высушенной упариванием с абс. пиридином смеси 150 мг (IV) [6,3 мкмоль d (T-G-Ap)] и 38 мг (63 мкмоль) d (T-T) в 5 мл абс. пиридина добавляли 6,5 мг (20 мкмоль) триизопропилбензолсульфохлорида и смесь перемешивали 20 ч. Полученный полимер-пентануклеозидтетрафосфат (VII) отмывали, как описано в опыте 3, и высушивали в вакууме. После снятия смеси олигонуклеотидов с носителя и удаления защитных групп обработкой конц. раствором аммиака (4 ч, 50°), а концевой 3'-фосфатной группы d (T-G-Ap) фосфомоноэстеразой (КФ 3.1.3.1) реакционную смесь разделяли сначала электрофорезом, а затем последовательной трехкратной БХ в системе А. Выход пентануклеозидтетрафосфата (VIII) 38%, считая на исходный продукт (III).

г) Фосфорилировали 200 мг полимер-тринуклеотида (III) [10 мкмоль d (T-G-A)], как описано в опыте 5 а, и после отмывки абс. пиридином добавляли раствор 58 мг (100 мкмоль) d (T-T) в 5 мл абс. пиридина. Смесь перемешивали 36 ч при 20°, отмывали полимер-пентануклеозидтетрафосфат (VII) стандартным набором растворителей и высушивали в вакууме. После обработки, описанной в опыте 5 в, выход (VIII) составлял 41%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simidzu T., Letsinger K. (1971) Bull. Chem. Soc. Jap., 44, 1673—1677.
2. Ohtsuka E., Morioka S., Ikehara M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 3229—3233.
3. Потапов В. К., Кочеткова М. Н., Звездина В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1973) Докл. АН СССР, 209, 364—366.
4. Кабачник М. М., Тимофеева Н. Г., Буданов М. В., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1973) Ж. общ. химии, 43, 379—384.
5. Потапов В. К., Кочеткова М. Н., Шабарова З. А. (1971) Ж. общ. химии, 41, 240—241.
6. Буданов М. В., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., (1975) Докл. АН СССР, 220, 841—843.
7. Грачев М. А. (1973) в сб. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот (под ред. Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В.), стр. 104—122, «Наука», М.
8. Koster H., Cramer F. (1972) J. Libigs Ann. Chem., 766, 6—15.
9. Ralph R. K., Connors W. J., Schaller H., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 1983—1989.
10. Schaller H., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821—3828.

Поступила в редакцию
6.III.1975

POLYMER-SUPPORTED SYNTHESIS OF PENTANUCLEOSIDE TETRAPHOSPHATE BY THE BLOCK METHOD

TUMANOV U. V., SHLAPNIKOV M. G., POTAPOV V. K.,
SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

A possibility to join oligonucleotide blocks via the 3'-end oligonucleotide phosphate group bound to a crosslinked (40% DVB) macroporous polymer support has been exemplified by synthesis of a pentanucleoside tetraphosphate, d(T-G-A-T-T) I. The synthesis of d(T-G-A)II and d(T-T)III blocks has been carried out by the solid phase method with yields of 63% and 90%, respectively (in respect to initial polymer-thymidine). Imidazolidine of phosphorhydroxychloride was used for phosphorylation of II, block III was joined in two ways, i. e. with and without use of a condensing agent (TPS) via 3'-chlorophosphate group of II. The yield in both cases was about 40% (in respect to the initial II).