



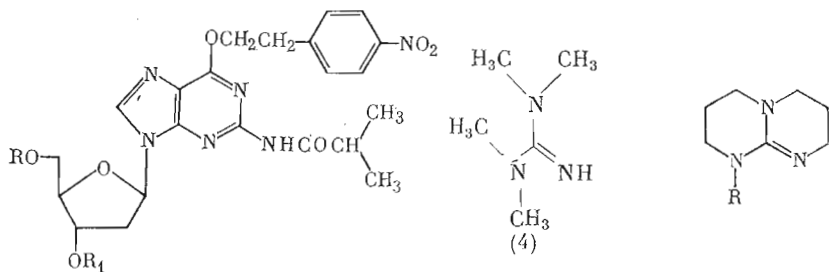
УДК 547.113.6:547.963.32

БЫСТРОЕ УДАЛЕНИЕ *n*-НИТРОФЕНИЛЭТИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ С О⁶-ПОЛОЖЕНИЯ ГУАНИНОВОГО ОСНОВАНИЯ

Чернов Б. К., Голова Ю. Б., Позмогова Г. Е.

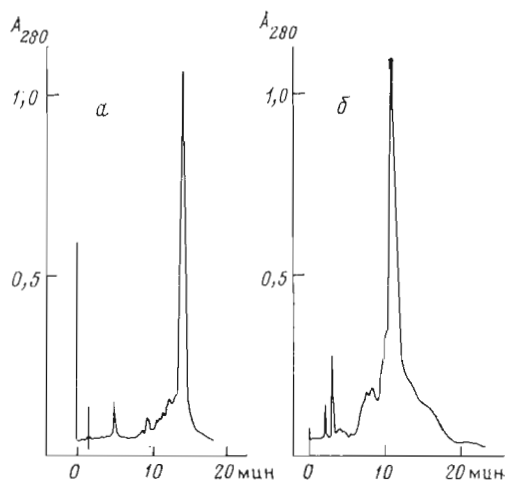
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Известно, что химический синтез олигонуклеотидов сопровождается многочисленными побочными реакциями [1–3]. В рамках фосфитного метода наиболее драматическими по своим последствиям являются процессы с участием О⁶-карбонильной функции гуанина. Именно поэтому получение гуанозин-богатых последовательностей представляет задачу особой сложности. Устранить нежелательные побочные процессы можно введением дополнительной защитной группы по О⁶-положению гуанинового остатка. Среди предложенных для этой цели защит привлекает внимание *n*-нитрофенилэтильная (NPE) [4]. Она вводится с высоким выходом, устойчива в широких интервалах pH, сохраняется при элонгации нуклеотидной цепи. Удаление NPE-защитной группы происходит при действии сильных органических оснований по механизму β-элиминирования. Реакция деблокирования протекает за 40–180 мин практически с количественным выходом в случае нуклеозидов или мононуклеотидов, тогда как для протяженных синтетических олигонуклеотидов требуются более жесткие условия. Так, при синтезе d(G₂₄T)NPE-защиту с остатков гуанина удалось снять лишь на заключительном этапе деблокирования обработкой олигонуклеотида в течение 72 ч при 50° С 1 М раствором 1,8-дизабицикло[5, 4, 0]-ундец-7-ена в пиридине [1]. Поскольку такие условия не удовлетворяют требованиям современного олигонуклеотидного синтеза, нами исследованы потенциальные деблокирующие агенты – органические основания гуанидинового ряда: 1,1,3,3-тетраметилгуанидин (4), 1,5,7-тризабицикло[4.4.0]дец-5-ен (5) (TBD) и его 7-метильное производное (6) (MTBD). Лучшим из рассмотренных соединений оказался TBD. 0,5 М раствор этого реагента в пиридине обеспечивает избирательное снятие NPE-защиты с нуклеозида (1) за 10 мин при 20° С и 3 ч в диоксане. Несмотря на то что основания (4) – (6) обладают близкими значениями pK_a, тетраметилгуанидин (4) не элиминирует NPE-защиту, а соотношение скоростей реакции деблокирования в присутствии MTBD (6) и TBD (5) составляет 1 : 15.



- 1) R = R₁ = H
- 2) R = H, R₁ = –CO(CH₂)₂CONH – P
- 3) R = DMTr, R₁ = –P(OCH₃)N[CH(CH₃)₂]₂
- 4) R = H
- 5) R = H
- 6) R = CH₃

P – полимерный носитель



ВЭЖХ олигонуклеотида (9) в ионообменном (а) и обращенно-фазовом (б) режимах

С полимернуклеозида (2) NPE-защита количественно удаляется с помощью TBD за 15 мин в пиридине без разрыва сложноэфирной и амидной связей якорной группы. Таким образом, наряду с высокой активностью этот реагент обладает строгой избирательностью по отношению к NPE-защитной группе.

Принципиально важным является вопрос о том, насколько эффективно основание (5) удаляет NPE-защиту в составе G-богатых олигонуклеотидов. Для этого с использованием блока (3) в неавтоматическом режиме на полимерном носителе фосфамидитным методом [5] были синтезированы три последовательности: $d(C_5G_5)$ (7), $d(CG_5)$ (8) и $d(GTCTGGAGGTGGGCAGGTGG)$ (9). Полностью защищенные олигонуклеотиды, связанные с полимерной матрицей, обрабатывали 30 мин 0,5 М раствором TBD в пиридине, носитель промывали пиридином и диоксаном и далее проводили стандартный цикл деблокирования. После выделения с помощью ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотиды (7–9) получены с выходом 40, 36 и 27% соответственно. На рисунке представлены хроматографические профили выделения 20-мера (9): а – колонка Zorbax-NH₂, 9,4×250 мм, буфер А – 0,1 М NH₄OAc в 60% формамиде, pH 6,0; буфер Б – 2,0 М NH₄OAc в 60% формамиде, pH 6,0. Градиент от 10 до 100% Б, 30 мин, скорость потока 4,0 мл/мин, температура 55°С; б – колонка Zorbax-ODS, 9,4×250 мм, градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 25% в 0,1 М NH₄OAc за 30 мин при скорости потока 4,0 мл/мин.

Анализ олигонуклеотидов (7) – (9) в 20% денатурирующем ПААГ после введения 5'-концевой ³²P-метки показал, что они представлены единственной полосой целевого продукта. Их структура подтверждена методом Максама – Гилберта, а нуклеотидный состав – хроматографическим анализом продуктов ферментативного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 18. P. 6447–6465.
2. Gao X., Gaffney B. L., Senior M., Riddle R. R., Jones R. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 2. P. 573–584.
3. Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 21. P. 2525–2528.
4. Himmelsbach F., Schulz B. S., Trichtinger T., Charubala R., Pfeleiderer W. // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 1. P. 59–72.
5. Barone A. D., Tang J. Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051–4061.

Поступило в редакцию
29.XII.1986

RAPID REMOVAL OF THE *p*-NITROPHENYLETHYL BLOCKING
GROUP FROM THE O⁶-POSITION OF GUANINE BASE

CHERNOV B. K., GOLOVA Yu. B., POZMOGOVA G. E.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A number of potential reagents for removing the *p*-nitrophenylethyl blocking group from O⁶-position of guanine have been investigated, and 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en possesses is shown to be the best. Effective use of this reagent was demonstrated on the synthesis of dG-rich oligodeoxyribonucleotides, viz. d(C₅G₅), d(CC₆), d(CTCTGGAGGT-
GGGCAGGTGG).