



УДК 577.133.6:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
С КОНЦЕВЫМИ ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ

*Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А.,
Ореукая Т. С., Потанов В. К., Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

На автомате-синтезаторе «Виктория-4М» в рамках фосфитамидной схемы синтеза получены 3'- и 5'-фосфорилированные олигодезоксирибонуклеотиды. Предложены два подхода к синтезу таких соединений: введение концевых рибозвеньев как потенциальных источников фосфатных групп или же применение гидроксилсодержащих полимерных носителей, присоединение первого нуклеотида к которым происходит в автомате-синтезаторе по стандартной методике, а отщепление целевого продукта с полимера может проходить по реакции β -элиминирования. Показано, что выходы олигонуклеотидов, полученных по обеим схемам, практически одинаковы. С использованием первого метода были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие нуклеозиды с измененной конфигурацией сахара, — *ксило*-тимидин и *арабино*-уридин.

В соответствии с проблемами, которые решают современная молекулярная биология, генетическая инженерия, биотехнология, актуальным представляется синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих модифицированные межнуклеотидные связи и нуклеотидные звенья, а также 3'- и 5'-концевые фосфатные группы. Для решения последней задачи в настоящей работе в рамках стандартной фосфитамидной схемы [1] были рассмотрены два пути. Первый заключается в развитии предложенного ранее [2, 3] способа получения таких соединений, основанного на введении концевых рибозвеньев как потенциальных источников фосфатных групп. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с 3'-концевыми рибозными звеньями осуществляли на неорганических носителях типа СРG-500 и силохром С-80. Модификацию полимеров проводили аминопропилтриэтоксисиланом, янтарным ангидридом с последующим присоединением метокситритилуридина [4]. Загрузка полимеров уридином, определенная по монометокситритильной группе, составляла 65 мкмоль/г для силохрома С-80 и 16 мкмоль/г для СРG-500. На носителях обоих типов были синтезированы олигонуклеотиды d(ACGGAT)U, d(AACCTAC)U, d(GATCCGGAATTCA)U, d(AACCTACCT)U с выходами на стадию 90—98% и общими выходами после выделения 9—26%. При этом выходы на первых стадиях наращивания олигонуклеотидной цепи, особенно на высокозагруженных носителях на основе силохрома С-80, оказались ниже (75—88%), чем на последующих, что согласуется с известными данными [5]. Поэтому представлялось интересным увеличить длину спейсерной группы (что увеличивает выход на первой стадии конденсации), не снижая загрузку носителя первым нуклеозидом. Удобным и простым оказался подход с использованием в качестве промежуточного звена 1,3-пропиленгликоля.

Принятые сокращения: MeIm — N-метилимидазол, TPS — триизопропилбензолсульфохлорид, ib — изобутирил, MeOTr — монометокситритил, Tetr — тетразол, DMAp — 4-N,N-диметиламинопиридин, Tf — тефлон, Ps — полистирол, Si — силикагель, dxT — 9- β -D-2'-дезоксиксифлураинозилтимидин (*ксило*-тимидин), aU — арабинозилуридин (*арабино*-уридин).

**Синтез олигонуклеотидов с 3'-концевыми фосфатными группами
на β-оксиэтилсульфоновых полимерах**

Олигонуклеотид	Длина	Тип полимера	Выход по MeOTg-группе, %	
			на первый нуклеотид	на стадию
d(TGTGTATp)	7p	V	60	92
d(AGCTTGp)	6p	V	82	96
d(AGTA)Gp	5p	V	24	70
d(ACGGA)Up	6p	III	26	70
d(GTTTGCTCCCCp)	11p	III	13,0	80
d(GTATCTAATCCTGTTTGCTCp)	20p	VI	59	97,5
d(CTGCCTATTGTCTATTTp)	18p	VI	65	98
d(CTGCCTATTAGTCTATTTp)	19p	VI	63	98
d(GTGTATGCCATTp)	12p	V	8	80
d(AGCTTGGCTGCAP)	12p	V	29	90
U(5'-5')d(AGCTTGGCTGCAP)	p12p	VI	34	91
d(GGACCACCGCGp)	11p	VI	45	93

в CH_2Cl_2 и сжимаются в CH_3CN ; отмывка с них монометокситритилкарбинола при удалении защитной группы в процессе синтеза олигонуклеотидов происходит значительно медленнее, чем для полимеров на основе С-80. На полистирольном полимере типа (II) не удается получить большие загрузки первым нуклеотидом. Кроме того, сильное изменение объема полимера при смене растворителя не позволяет использовать его в реакторах проточного типа. Поскольку полимер (IV) имеет более короткую спейсерную группу, чем полимер (V), мы проводили синтезы обычно на полимерах типа (V) и (VI).

Контрольные эксперименты с полимерами, имеющими β-оксиэтилсульфоновые якорные группы, показали, что растущий олигонуклеотид сохраняется на носителе в течение синтетического цикла несмотря на то, что при блокировании непрореагировавших 5'-ОН-групп используется смесь, содержащая сильный амин (диизопропилэтиламин). При удалении с межнуклеотидного фосфата метильных защитных групп тиофенолятом триэтиламония также не наблюдается потери нуклеотидного материала. Отщепление олигонуклеотида с полимера происходит при обработке его смесью $\text{Et}_3\text{N}-\text{Py}$ 1 : 3 в течение 3 ч при 20° С.

В соответствии со стандартной фосфитамидной схемой [4] на синтезаторе «Виктория-4М» был осуществлен полностью автоматический синтез олигонуклеотидов с концевыми фосфатными группами, первичные структуры которых представлены в таблице.

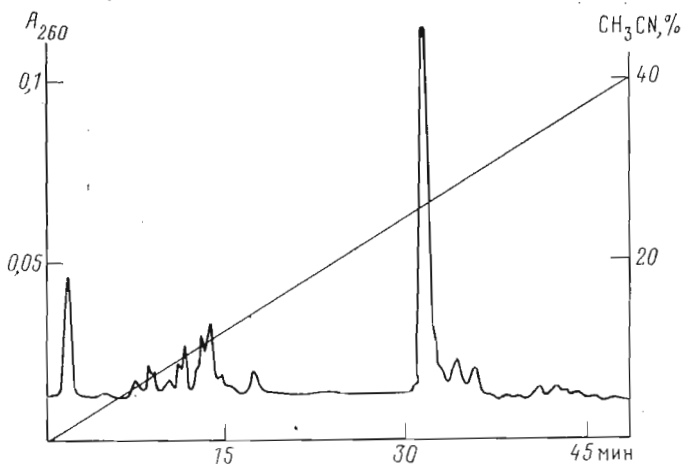
Таким образом, носитель, полученный на основе силохрома С-80, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к полимерным носителям для синтеза олигонуклеотидов, и позволяет быстро и эффективно получать достаточно протяженные олигомеры с концевыми фосфатными группами.

Экспериментальная часть

Синтез олигонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР по методике [4].

В работе использовали 2'-дезоксинуклеозиды и силикагель марки «Силохром С-80» отечественного производства, N-метилимидазол, тетразол, аминокпропилтриэтоксисилан, триметилхлорсилан, N-этилдиизопропиламин (Fluka, Швейцария), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Worthington Biochemical Corp., США), фосфомоноэстеразу (КФ 3.1.3.1, Sigma, США), 1,3-пропандиол (Ferak, ФРГ). $\text{MeOTgOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ и $\text{MeOTgOCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ получали по стандартной методике тритилирования нуклеозидов [3] и выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в хлороформе.

Модификация полимерных носителей. К 5 г полимерного носителя силохром С-80 с сукцинатной якорной группой, полученного согласно работе [4], в 8 мл абс. пиридина добавляли 2 ммоль $\text{MeOTgOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 4 ммоль TPS, 12 ммоль MeIm и встряхивали 1,5 ч при 20° С. Полимер отмывали абс. пиридином, этанолом и эфиром. MeOTg-группу удаляли промывкой полимера 1% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Далее присоединяли янтарный ангидрид [4].



Анализ реакционной смеси после синтеза MeOTrd(GGACCA·CCGCGp) на полимере (V) обращенно-фазовой ВЭЖХ (условия см. «Экспер. часть»)

Получение полимеров с β -оксиэтилсульфоновой якорной группой. Синтез полимера (II). 5 г хлорметилированного полистирола (1 ммоль/г, 2% сшивки, 40–60 мкм) добавляли к раствору 25 ммоль $\text{NaSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ в 10 мл метанола. Полимер дегазировали и оставляли на 12 ч, после чего отмывали последовательно водой, этанолом и эфиром. 3 г полученного полимера заливали 40 мл диоксана и 10 мл смеси $\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}$, 1:2 (v/v), а затем добавляли 5 мл 30% H_2O_2 . Раствор оставляли на 24 ч при 20° С. Полимер отмывали последовательно водой, этанолом и эфиром. **Синтез полимера (III)** проводили аналогично, используя полистирол, привитый на тефлоновые гранулы. Хлорметилирование на первой стадии проводили по методике [8]. **Синтез полимера (VI):** сукцинатный полимер (2,5 г) на основе силохрома С-80, полученный как указано выше, обрабатывали смесью $\text{MeOTrOCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (852 мг, 2 ммоль), TPS (1,8 г, 6 ммоль) и N-метилимидазола (1,5 мл, 18 ммоль) в 10 мл абс. пиридина 1,5 ч при 20° С. Полимер отмывали абс. пиридином, этанолом, эфиром и сушили в вакууме.

Присоединение уридинового звена к полимерному носителю. К 2 г полимерного носителя (силохром С-80 или СРG) с сукцинатной якорной группой, суспендированного в 5 мл абс. пиридина, добавляли 1 ммоль 5'-O-(MeOTr)U, 3 ммоль TPS и 6 ммоль MeIm и встряхивали 1,5 ч, затем смесь обрабатывали 150 мкл абс. метанола и встряхивали вновь еще 30 мин. Полимер отмывали абс. пиридином и абс. ацетонитрилом и добавляли 8 мл смеси $\text{Ac}_2\text{O}-\text{Pr}_2\text{EtN}-\text{MeIm}-\text{CH}_3\text{CN}$ (4,5:4,5:1:30), выдерживали 30 мин. Полимерный носитель отфильтровывали, промывали последовательно абс. пиридином, этанолом, эфиром и сушили в вакууме.

5'-O-Монометокситритил-3'-(N,N-диизопропиламида)метилфосфит 9- β -D-2'-дезоксиксилофуранозилтимина (VII). Смесь 500 мг (1 ммоль) 5'-O-монометокситритил-ксилотимидина, полученного по стандартной методике [9], и 85 мг диизопропиламмонийтетразолида высушивали 12 ч в вакууме, растворяли в 5 мл хлористого метилена и прибавляли 300 мкл бис(N,N-диизопропиламида)метилфосфита. Реакцию контролировали ТСХ в системе хлороформ – этанол (93:7) с добавлением 2% триэтиламина (R_f соединения (VII) 0,7). По окончании реакции (5 ч) реакционную смесь обрабатывали по стандартной методике [6]. Выход соединения (VII) 50%.

5'-O-Монометокситритил-3'-(N,N-диизопропиламида)метилфосфит 0²,2'-ангидроуридина (VIII) получали по методике [6], исходя из 500 мг (1 ммоль) 5'-O-монометокситритил-ангидро-уридина. В качестве растворителя был применен ацетонитрил (в хлористом метиле исходное соединение нерастворимо), реакцию проводили в гетерогенном варианте, используя хорошую растворимость фосфитамида в ацетонитриле. Время реакции 24 ч. Целевой продукт получали отделением от непрореагировавшего осадка фильтрованием и дальнейшей обработкой согласно работе [6]. Выход соединения (VIII) 70%.

Окисление и β -элиминирование концевой рибозевого в олигонуклеотидах проводили по методике [2].

Удаление защитных групп осуществляли по методике [4].

Анализ и выделение олигонуклеотидов, содержащих монометокситритильную группу, проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ (см., например, рисунок) на приборе Altex (США) (носитель – Лихросорб С-18 (10 мкм, Merck, ФРГ), размер колонки 4,6×250 мм, в градиенте концентрации (0–40%) ацетонитрила в 0,05 М ацетате аммония, скорость элюции 1 мл/мин), а затем, после удаления тритильной группы, повторно в обращенно-фазом (0–12% ацетонитрила) или ион-парном вариантах в зависимости от длины биополимера и его состава. Ион-парную хроматографию осуществляли на приборе Gilson (Франция) (носитель – Полион Si-100 С18 (10 мкм),

колонок 7,6×250 мм, в градиенте (5–25%) ацетонитрила в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7, в присутствии 5 мМ тетрабутиламмоний-катиона).

Первичную структуру олигонуклеотидов подтверждали твердофазным методом секвенирования [10].

Нуклеозидный состав гептануклеотидов d(ACGGAxT)U и d(ACGGA)aUU определяли гидролизом 0,2 ОЕ₂₆₀ вещества смесью фосфодиэстеразы и фосфомоноэстеразы змеиного яда в течение 3 ч при 37°С с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ в изократическом режиме на хроматографе Altex (США) на колонке (4,6×250 мм) с Лихросорбом RP18 (10 мкм, Merck, ФРГ). Элюцию проводили 6% метанолом в 0,1 М ацетате аммония.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грязнов С. М., Потанов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 988–991.
2. Krupnitskaya N. F., Zayakina G. V., Oretskaya T. S., Volkov E. M., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 33–43.
3. Волков Е. М., Грязнов С. М., Крынецкая Н. Ф., Орецкая Т. С., Потанов В. К. // Химия природ. соедин. 1986. № 2. С. 228–234.
4. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потанов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604–1611.
5. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 920–926.
6. Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051–4061.
7. Волков Е. М., Орецкая Т. С., Потанов В. К. // Химия природ. соедин. 1985. № 6. С. 849–850.
8. Потанов В. К., Туркин С. И., Вейко В. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 241. № 6. С. 1352–1354.
9. Цытович А. В., Орецкая Т. С., Долинина Н. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Химия природ. соедин. 1987. № 3. С. 421–425.
10. Rosental A., Jung R., Hunger H.-D. // Meth. Enzymol. 1987 V. 155. P. 301–331.

Поступила в редакцию
19.I.1988

AUTOMATIC SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES WITH TERMINAL PHOSPHATE GROUPS

VOLKOV E. M., ROMANOVA E. A., KRUG A., ORETSKAYA T. S.,
ПОТАНОВ В. К., ШАБАРОВА З. А.

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

3'- and 5'-phosphorylated oligodeoxyribonucleotides have been synthesized on the «Victoria-4M» automatic synthesizer by phosphoramidite method. Two approaches have been suggested: introduction of a terminal ribo-unit as a potential source of phosphate group or the use of hydroxyl-containing polymer supports which loose the end product of the synthesis via β -elimination reaction. Yields of oligonucleotides obtained according to both schemes proved to be almost identical. Using the first approach, oligonucleotides containing units with altered configuration of the sugar (*xylo*-thymidine and *arabino*-uridine) have been obtained.