



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 14 * № 8 * 1988

УДК 577.433.6:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С КОНЦЕВЫМИ ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ

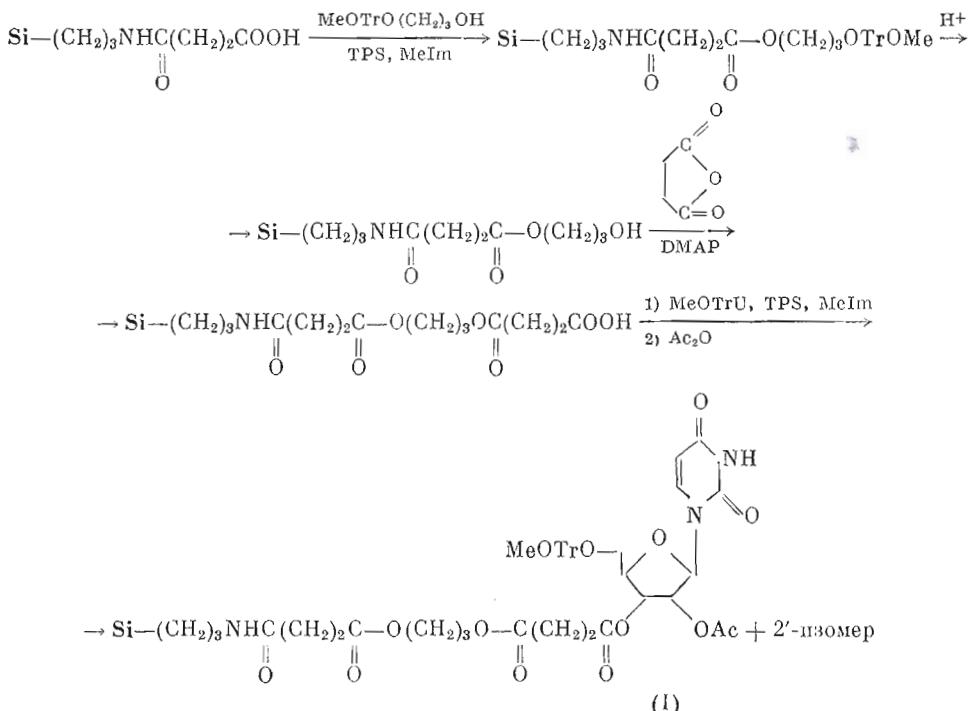
*Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А.,
Орецкая Т. С., Потапов В. Г., Шабарова З. А.*

*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 рибозиленов 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-эlimинирования. 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 рибозиленов как потенциальных источников фосфатных групп. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с 3'-концевыми рибозными звеньями осуществляли на неорганических носителях типа CPG-500 и силохрома С-80. Модификацию полимеров проводили аминопропилтриэтоксисиланом, янтарным ангидридом с последующим присоединением метокситритиуридина [4]. Загрузка полимеров уридином, определенная по монометокситритильной группе, составляла 65 мкмоль/г для силохрома С-80 и 16 мкмоль/г для CPG-500. На носителях обоих типов были синтезированы олигонуклеотиды d(ACGGAT)U, d(AACCTAC)U, d(GATCCGGAATTCA)U, d(AACCTTACCT)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 – триизопропилябензольсульфохлорид, iB – изобутирил, MeOTr – монометокситритил, Tetr – тетразол, DMAP – 4-N,N-диметиламинопиридин, Tf – тефлон, PS – полистирол, Si – силикагель, d³T – 9-β-D-2'-дезоксицилофуранозилтимин (ксило-тимидин), aU – арабинозилурацил (арабино-уридин).



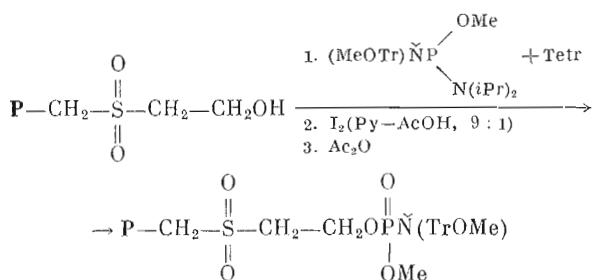
Носитель (I), полученный по этой схеме, при загрузке уридином 60 мкмоль/г давал стабильные и высокие выходы как на начальных, так и на конечных стадиях синтеза олигомера. На этом полимере были получены 12 олигонуклеотидов длиной 6–26 звеньев с выходами на стадию 96–99%, а также гептануклеотиды, содержащие нуклеозид с измененной конфигурацией сахарного фрагмента: *ксило*-тимидин и *арабино*-уридин – d(ACGGAxT)U и d(ACGGA)auU. Следует отметить, что фосфитилирование 5'-О-монометокситритил-9-β-D-дезоксицилофуранозилтимина и 5'-О-монометокситритил-О^{2'},2'-ангидроуридина (получение исходных компонентов для синтеза) проходит с некоторым увеличением времени реакции по сравнению с немодифицированными дезоксинуклеозидами [6]. Нуклеозидный состав гептануклеотидов был подтвержден анализом с помощью ВЭЖХ гидролизата препаратов фосфодиэстеразой и фосфомоноэстеразой змеиного яда (сравнение с контрольной смесью нуклеозидов).

Полученные олигонуклеотиды с 3'-концевыми рибозными звеньями после избирательного окисления рибозы и β-элиминирования превращаются в олигонуклеотиды, фосфорилированные по 3'-концу. Достоинствами данного метода являются доступность полимерных носителей, стандартность процессов синтеза и выделения олигонуклеотидов, возможность иммобилизации этих олигомеров на полимерном носителе, содержащем NH₂-группу, после окисления рибозного звена.

С использованием носителей, содержащих аминопропильные функциональные группы на основе силохрома С-80 с присоединенным первым нуклеозидным звеном через сукцинатную якорную группу, был получен ряд олигонуклеотидов с рибозным звеном на 5'-конце. В этом случае на последней стадии синтеза олигонуклеотида после удаления монометокситритильной группы в конденсацию вводили 5'-O-(N,N-диизопропиламидо)-метилфосфит 2',3'-O-дibenзоилуридина. В результате этой реакции образуется 5'-5'-фосфоэфирная связь, и полученный таким образом концевой блок может служить источником 5'-концевой фосфатной группировки. Так был синтезирован, например, олигонуклеотид U(5'-5')d(AGCTTGCTGCA), который после окисления и β-элиминирования приводил к d(pAGCTTGCTGCA) с общим выходом 7% (20 ОЕ₂₆₀ чистого вещества).

Разрабатывая общую стратегию синтеза олигодезоксирибонуклеотид-

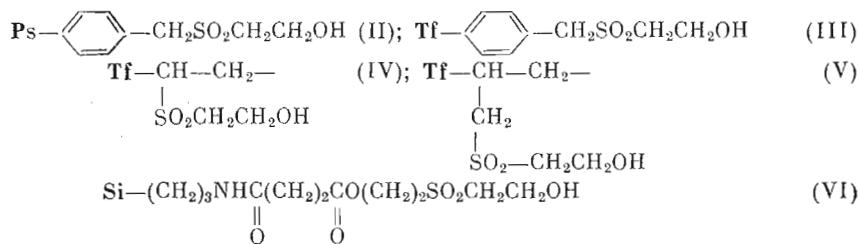
3'-фосфатов, мы решили найти прямой метод введения фосфата в олигонуклеотид на твердой фазе. Это представляется возможным при использовании такого полимера, посадку на который первого нуклеотидного звена можно проводить в автомате-синтезаторе, а отщепление олигонуклеотида с концевой фосфатной группой — по реакции β -эlimинирования.



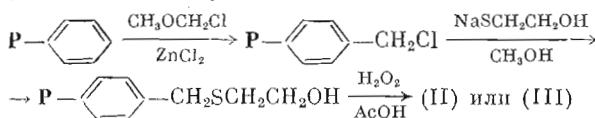
где \mathbf{P} – полимерный носитель различной природы;



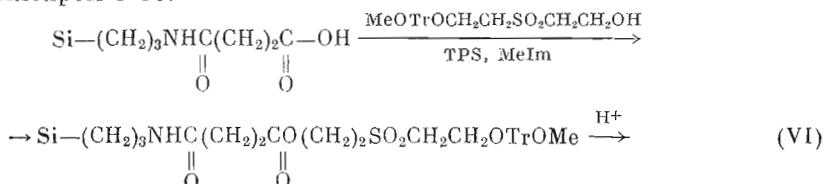
Мы остановили свое внимание на полимерах с β -оксиэтилсульфоновой якорной группой, аналогичных описанным ранее [7] для иммобилизации олигонуклеотидов:



Полимеры (II) и (III) получали по схеме



Полимеры (II) и (III) отличаются структурой исходной полимерной матрицы: (II) получен из хлорметилированного полистирола (1 ммоль/г, 2% сшивки, 40–60 мкм), а (III) – из полистирола, привитого на тефлон [8]. Полимер типа (IV) получен радиационной прививкой мономера $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ на тефлоновые гранулы с дальнейшим окислением сульфида в сульфон. Синтез полимерного носителя (V) описан ранее [7]. Полимерный носитель (VI) был получен на основе другой матрицы – силикагеля силохром С-80.



Количество якорных групп определялось по тритирированию первичных гидроксильных групп избытком MeOTrCl и кислотному гидролизу всех тритиевых эфиров. Загрузка составляла 160, 160, 540, 260, 88 мкмоль/г для (II) – (VI) соответственно.

Первые же проверки механических свойств полимеров показали, что силикагельный носитель практически не изменяет своего объема при смене растворителей в стандартном цикле операций (соответственно не меняется и скорость промывок). Полимеры привитого типа слегка набухают

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

Олигонуклеотид	Длина	Тип полимера	Выход по MeOTr-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(ACCGA)Up	6p	III	26	70
d(GTTTGCTCCCCp)	11p	III	13,0	80
d(GTATCTAACCTGTTGCTCp)	20p	VI	59	97,5
d(CTGCCTATTGTCATTTP)	18p	VI	65	98
d(CTGCCTATTAGTCATTTP)	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 монометокситритилкарбинала 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 (дизопропилэтамин). При удалении с межнуклеотидного фосфата метильных защитных групп тиофенолятом триэтиламмония 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 [1] на синтезаторе «Виктория-4М» был осуществлен полностью автоматический синтез олигонуклеотидов с концевыми фосфатными группами, первичные структуры которых представлены в таблице.

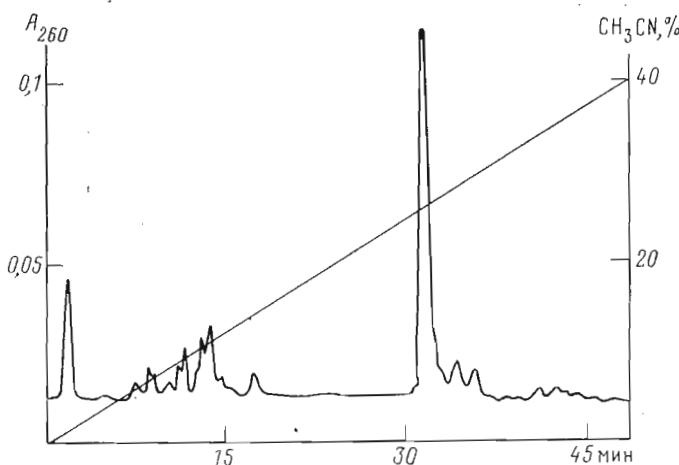
Таким образом, носитель, полученный на основе силохрома С-80, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к полимерным носителям для синтеза олигонуклеотидов, и позволяет быстро и эффективно получать достаточно протяженные олигомеры с концевыми фосфатными группами.

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'-дезоксирибонуклеозиды и силикагель марки «Силохром С-80» отечественного производства, N-метилимидазол, тетразол, аминопропилтриэтоксисилан, trimethylchlorosilane, N- этилдиизопропиламин (Fluka, Швейцария), фосфодиэтеразу змеиного яда (KF 3.1.4.1, Worthington Biochemical Corp., США), фосфомоноэтеразу (KF 3.1.3.1, Sigma, США), 1,3-пропандиол (Ferak, ФРГ). $\text{MeOTrOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ и $\text{MeOTrOCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 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 $\text{MeOTrOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 4 ммоль TPS, 12 ммоль MeOTr и встряхивали 1,5 ч при 20° С. Полимер отмывали абс. пиридином, этанолом и эфиром. MeOTr -группу удалили промывкой полимера 1% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метилене. Далее присоединили 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)¹ добавляли к раствору 25 ммоль NaSCH₂CH₂OH в 10 мл метанола. Полимер дегазировали и оставляли на 12 ч, после чего отмывали последовательно водой, этанолом и эфиром. Затем полученного полимера заливали 10 мл диоксана и 10 мл смеси AcOH–H₂O 1:2 (v/v), а затем добавляли 5 мл 30% H₂O₂. 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 MeOTrOCH₂CH₂SO₂CH₂CH₂OH (852 мг, 2 ммоль), TPS (1,8 г, 6 ммоль) и N-метилимидазола (1,5 мл, 18 ммоль)² 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 CPG) 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 Ac₂O–Pr₂EtN–CH₃CN (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'-дезокси-ксилофуранозилтимина (VII). Смесь 500 мг (1 ммоль) 5'-O-монометокситритил-ксилотимидина, полученного по стандартной методике [9], и 85 мг диизопропиламмоний-тетразолида 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*, 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 O^{2',2'}-ангидроуридина (VIII) получили по методике [6], исходя из 500 мг (1 ммоль) 5'-O-монометокситритил-ангидро-уридина. В качестве растворителя был применен ацетонитрил (в хлористом метилене исходное соединение растворимо), 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 -эпиминирование концевого рибозевена 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 C-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-фазовом (0–12% ацетонитрила) или ион-парном вариантах в зависимости от длины биополимера и его состава. Ион-парную хроматографию осуществляли на приборе Gilson (Франция) (носитель – Полиол Si-100 C18 (10 мкм),

жолонка 7,6×250 мм, в градиенте (5–25%) ацетонитрила в 50 мМ калий-фосфатном буферо, 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 фосфомonoэтеразы 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 Ликросорбом RP18 (10 мкм, Merck, ФРГ). Элюцию проводили 6% метанолом в 0,1 М ацетате аммония.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грязнов С. М., Потапов В. К., Мегелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 988–991.
2. Krynetskaya 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. Volkov E. M., Грязнов С. М., Крынечкая Н. Ф., Орецкая Т. С., Потапов В. К. // Химия природ. соедин. 1986. № 2. С. 228–234.
4. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Мегелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604–1611.
5. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорганическая 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. Volkov E. M., Орецкая Т. С., Потапов В. К. // Химия природ. соедин. 1985. № 6. С. 849–850.
8. Потапов 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. Цыткович А. В., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Химия природ. соедин. 1987. № 3. С. 421–425.
10. Rosenthal 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.,
POTAPOV V. K., ZHABAROVA Z. A.

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.