



УДК 577.113.6

Н-ФОСФОНАТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *n*-НИТРОФЕНИЛЭТИЛЬНОЙ  
ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ

Сканцова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт  
биотехнологии,  
Москва

*n*-Нитрофенилэтильная защитная группа была использована для блокирования эндоциклических амидогрупп гуанинового и тиминового нуклеозид-3'-гидрофосфитов. Показано, что сочетание полностью защищенных мономеров с конденсирующими реагентами — пивалоилхлоридом и мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолом — позволяет проводить эффективный Н-фосфонатный синтез длинных олигонуклеотидов.

Ранее мы сообщали о синтезе олигодезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным твердофазным методом в шприце [1]. В процессе работы было замечено, что взаимодействие MSNT с гуаниновым и тиминовым Н-фосфонатными мономерами с незащищенной амидной группировкой гетероциклического основания приводит к образованию нежелательных побочных продуктов модификации. Обработка синтезированного олигонуклеотида смесью 1,1,3,3-тетраметилгуанидина и 4-нитробензальдоксима перед окончательным деблокированием давала возможность в основном устранить модификации и получить целевые продукты с хорошим выходом. Однако впоследствии мы столкнулись с рядом случаев, когда такая процедура не приводила к желаемому результату и выделение целевого продукта становилось практически невозможным.

В литературе имеются сведения о модификации O<sup>6</sup>-положения 2'-дезоксигуанозина в процессе олигонуклеотидного синтеза. Эндоциклическая амидная группировка гуанинового фрагмента способна взаимодействовать с производными сульфокислот [2, 3], фосфорилирующими [4, 5] и фосфитирующими [6] реагентами. Аналогичная эндоциклическая амидогруппа тимина, по-видимому, менее реакционноспособна, однако в литературе также имеются данные о целесообразности защиты O<sup>4</sup>-положения тимина в процессе олигонуклеотидного синтеза [7]. В работе [8] продемонстрировано преимущество применения O<sup>6</sup>-защищенного гуанинового и O<sup>4</sup>-защищенного тиминового мономеров в синтезе С- и Т-богатых олигонуклеотидов амидофосфитным способом.

Ранее нами было высказано предположение о протекании побочных реакций в процессе Н-фосфонатного олигосинтеза [1]. Дальнейшие наши исследования косвенно подтверждали это предположение. Не выясняя природу образующихся модифицированных продуктов, представлялось интересным провести сравнительные синтезы олигонуклеотидов с использованием как традиционных Н-фосфонатных мономеров, так и O<sup>6</sup>- и O<sup>4</sup>-защищенных соответственно гуанинового и тиминового нуклеозид-3'-гидрофосфитов.

Ранее был предложен ряд защитных групп для блокирования O<sup>6</sup>-положения гуанина. Так, для этой цели использовали дифенилкарбамоильную [9], β-цианэтильную [10] и *n*-нитрофенилсульфонилэтильную [11] группы; все они чувствительны к действию слабых азотистых осно-

Сокращения: MSNT — мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазол, PivCl — пивалоилхлорид, NPE — *n*-нитрофенилэтил. Префикс «d» (деокси) в обозначении олигодезоксирибонуклеотидов всюду опущен.

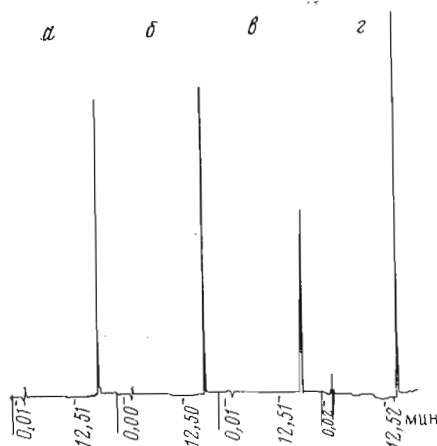


Рис. 1

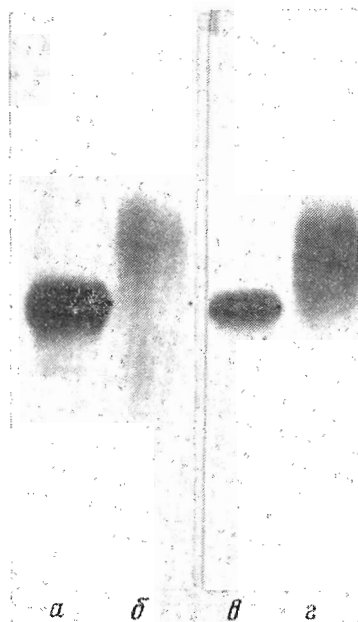
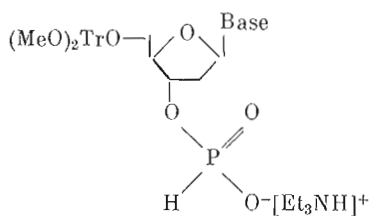


Рис. 2

Рис. 1. Проверка качества мономеров на колонке Nupersil ODS, 5 мкм (4,6 × 150 мм). Элюция в линейном градиенте (25—100%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (15 мин): а — (VIII), б — (VII), в — (III), г — (IV)

Рис. 2. Электрофорез в 20% денатурирующем ПААГ <sup>32</sup>P-меченых реакционных смесей после синтеза олигонуклеотидов (IX) и (X) с использованием традиционных мономеров (I)—(IV) (дорожки б, г) и мономеров (III)—(VIII) (дорожки а, в)

ваний (аммиак, третичные амины), что несколько осложняет выделение, очистку и хранение таких соединений. На наш взгляд, более удобна в работе NPE-группа [12], которая удаляется лишь под действием сильных органических оснований типа 1,8-диазацикло[5.4.0]ундец-7-ен [12] или 1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен [13].



Base

- I: тимин-1-ил
- II: N<sup>2</sup>-изобутирилгуанин-9-ил
- III: N<sup>1</sup>-бензоилцитозин-1-ил
- IV: N<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил
- V: N<sup>4</sup>-*n*-нитрофенилэтоксикарбонилцитозин-1-ил
- VI: N<sup>6</sup>-*n*-нитрофенилэтоксикарбониладенин-9-ил
- VII: O<sup>4</sup>-*n*-нитрофенилэтилтимидин-1-ил
- VIII: N<sup>2</sup>-изобутирил-O<sup>6</sup>-*n*-нитрофенилэтилгуанин-9-ил

Защищенные нуклеозид-3'-гидрофосфиты (I)—(VIII) получали обработкой защищенных нуклеозидов гексаэтилтриамидофосфитом в среде ацетонитрила в присутствии тетразола с последующим гидролизом образующихся 3'-тетраэтилдиамидофосфитных производных. Синтезированные мономеры очищали препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход составил 86—97%. Качество полученных мономеров периодически проверяли в процессе хранения (рис. 1). За месяц хранения мономеров в су-

## Синтезированные в работе олигонуклеотиды

Соединение	Последовательность	Длина
(IX)	TCGTGGAACCTCAGGGCCCTGACCAGCG	28
(X)	CCGGGAAGGTCTGCACGCCGCTGGTCAG	28
(XI)	AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA	28
(XII)	GTGACACTCTCCTGGGAGTTACCCGATT	28
(XIII)	TGGTCTCTTTTAGAGA	17
(XIV)	AATTGCTCGAGCTGCAG	17
(XV)	GAATTCCGGAATTC	14
(XVI)	GCTCGAGC	8
(XVII)	GATCGTGACCATG	13
(XVIII)	AATTCATGGTCAC	13
(XIX)	ATGCTCCAACCTTGCCGTT	18
(XX)	CAGTGCACGGTGGTGAC	17
(XXI)	TCAACAGTGGAGAGGGGC	18
(XXII)	GGACACCTGCAACTCGAT	18
(XXIII)	ATAATTGACSTTCCAT	18
(XXIV)	GATCAGGTTATC	12
(XXV)	AATTGATAACCT	12
(XXVI)	CTGACCCACCGACCATGGCTCAG	24
(XXVII)	CGGACAGTTTCGTTTCAG	17
(XXVIII)	GTCATAGCTGTTTCTG	17
(XXIX)	GGGCTGGCCGCCATCAT	17
(XXX)	TCAAATAAAGTAACGCA	17
(XXXI)	GGAATGGCCATCTTTGTTTTG	22
(XXXII)	GGGAGAGGAAACAGATCTATGATCAAAAAC	31
(XXXIII)	CAGTGCACGGTGGTGAC	17
(XXXIV)	GATTTAACAGTATCTTCAGCA	21
(XXXV)	AATTCSTTTTTCGCAAAAAG	18
(XXXVI)	AGATCTGCAAGGCCAAGGCAC	21
(XXXVII)	AGCTTGAATTCCTAAATAAGACTC	24
(XXXVIII)	AAAAGCCTGAATAATTTCTTTGAGCT	25
(XXXIX)	AATGAATACAATAAATCGATAGCTGCA	27
(XL)	GCTATCGATTTATTGTATTCATTAGCTCAAAGAA	34
(XLI)	ATATTCAGGGTTTTGAGTCTTATTTAGGAATTCA	34
(XLII)	CAGGAAACAGCTATGAC	17
(XLIII)	AATTTGCA	8
(XLIV)	GATCTGAAATGGTGGGAACSTGCGTTAAGGACGCATAATGAAGAAA	45
(XLV)	AATTTTCTTCATTATGCGTCTTAACGCAGTTCCACCATTTC	45

хом виде в атмосфере аргона при 4° С не наблюдалось потери диметокситритильной группы или окисления трехвалентного фосфора.

Для наращивания олигонуклеотидной цепи был использован 12,5 мМ раствор мономера в пиридине, который готовили непосредственно перед реакцией конденсации, быстро смешивали с 10-кратным избытком MSNT и забирали шприцем, в которой был помещен полимерный носитель, зажатый между двумя фильтрами из пористого титана.

Олигонуклеотиды (IX) и (X) (табл. 1) синтезировали с использованием MSNT и традиционных мономеров (I)—(IV), а также MSNT и мономеров (III)—(VIII) (рис. 2). Поскольку процедура растворения мономера и смешения его с MSNT занимала не более 15 с, мы предположили, что результаты синтеза, показанные на рис. 2б, г, обусловлены не потерей диметокситритильных групп в растворе, приводящей к образованию ( $n + 1$ ), ( $n + 2$ ) и т. д. олигомерных примесей, как было замечено в работах [14, 15], а образованием высокомолекулярных модифицированных олигонуклеотидов — вероятно, структур, разветвленных по гуаниновым и тиминновым остаткам (ср. рис. 2а, е). *n*-Нитрофенилэтильные защитные группы удаляли как в работе [13].

17- и 22-Звенные олигонуклеотиды (XXXIII), (XXXI) получены с использованием мономеров (III)—(VIII) и MSNT в качестве конденсирующего реагента (рис. 3). Аналогично были синтезированы олигонуклеотиды (IX)—(XXXIV) (табл. 1). Схема операций для одного цикла олигонуклеотидного синтеза в шприце с использованием MSNT дана в табл. 2. Цикл составлял 3—4 мин.

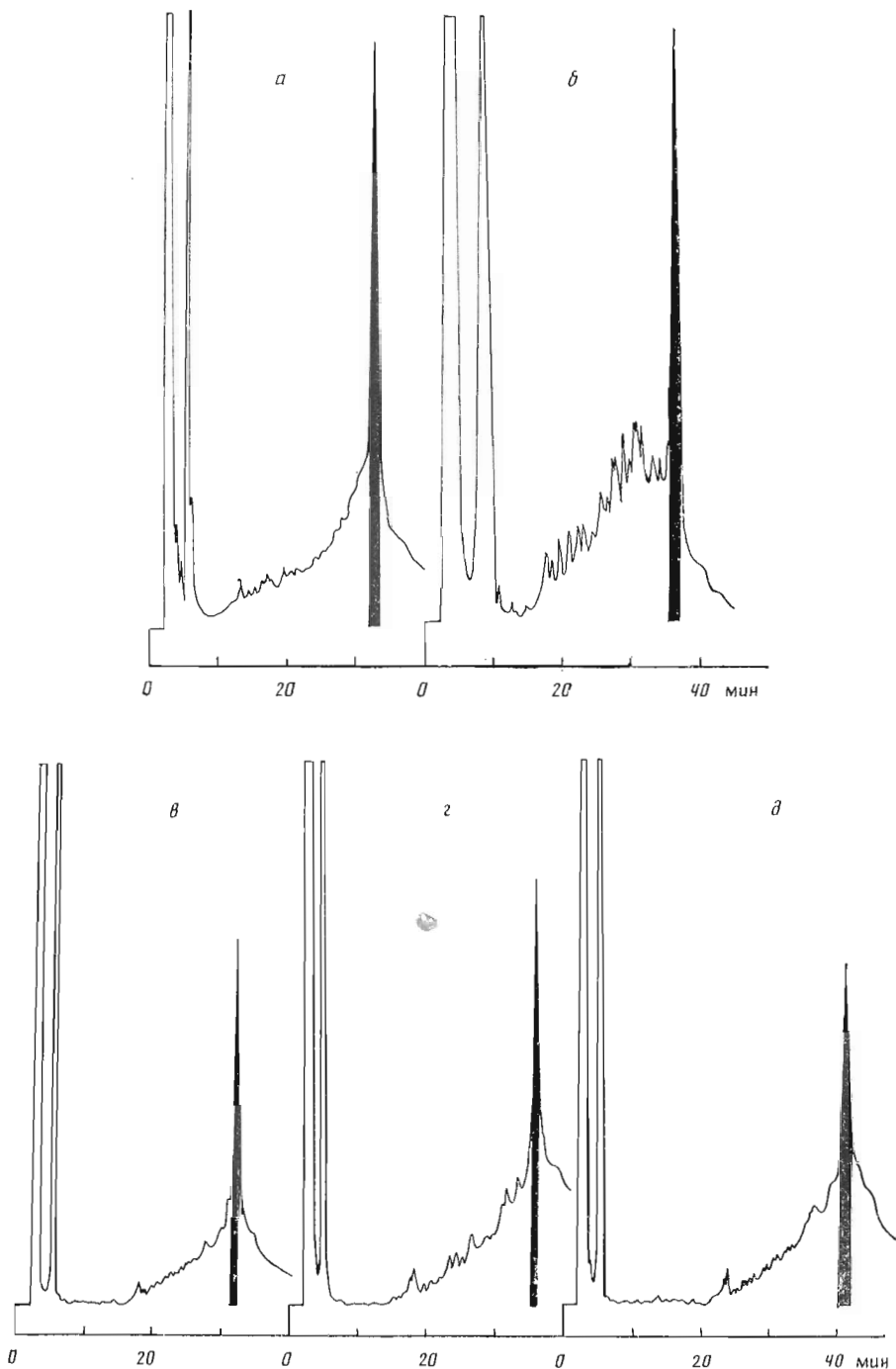


Рис. 3. Анионообменная ВЭЖХ смесей, содержащих олигонуклеотиды, на колонке Sunchropak AX300 (6,5 мкм; 4,6 × 250 мм) в линейном градиенте 0,05 М фосфат калия в 60% формамиде (рН 5,2) — 0,6 М сульфат аммония и 0,05 М фосфат калия в 60% формамиде, рН 5,5 (50 мин): *а* — (XXXIII), *б* — (XXXI), *в* — (XLII), *г* — (XXXIX), *д* — (XLV)

Далее нами была изучена возможность использования мономеров (III) — (VIII) в олигонуклеотидном синтезе с применением пивалоилхлорида в качестве конденсирующего реагента. Синтез проводили в шприце или ручном синтезаторе PS-100 фирмы Cnuaschem. В первом случае раствор мономера в пиридине засасывался в шприц на полимерный носитель, далее этот раствор выдавливали из шприца в пробирку с рассчитанным количеством раствора  $\text{PivCl}$  в ацетонитриле и полученную смесь тут же

Схема операций для одного цикла олигонуклеотидного синтеза с использованием MSNT

Операция	Растворители и реагенты	Время, мин (объем, мл)
Деблокирование	3% $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ в 1,2-дихлорэтано	0,75—пурины 1,25—пиримидины
Промывка	Пиридин	(2×0,3)
Конденсация	5 мкмоль мономера, 20 мкмоль MSNT <sup>2</sup> в 400 мкл пиридина	(2×0,3) 1,5
Промывка	MeCN	(2×0,3)

Таблица 3

Схема операций для одного цикла наращивания цепи Н-фосфонатным методом с использованием  $\text{PivCl}$ 

Операция	Растворители и реагенты	Время, мин (объем, мл)
Деблокирование	3% $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ в 1,2-дихлорэтано	0,75—пурины 1,25—пиримидины
Промывка	Пиридин	0,5 (1,5)
Конденсация	5 мкмоль мономера в 200 мкл пиридина, 25 мкмоль $\text{PivCl}$ в 200 мкл MeCN	1,5
Промывка	MeCN	0,5 (1,5)

засасывали обратно на носитель. Во втором случае раствор мономера вводили в колонку с полимерным носителем, затем вставляли в инжектор шприц с раствором  $\text{PivCl}$ , засасывали в него обратно раствор мономера и полученную смесь тут же вводили в колонку. Целью этих манипуляций было сведение к минимуму времени так называемого предсмешения, которое приводит к снижению эффективности Н-фосфонатного олигосинтеза [16—18].

Схема операций для одного цикла наращивания цепи Н-фосфонатным методом с использованием  $\text{PivCl}$  приведена в табл. 3. Скорость потока при работе на PS-100 составляла 3 мл/мин, общая продолжительность цикла 4—5 мин.

Данный способ был применен нами для синтеза олигонуклеотидов (XXXV) — (XLY) (табл. 1). На рис. 3 представлена анионообменная ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих 17- (XLII), 27- (XXXIX) и 45-звенный олигонуклеотид (XLV).

После анионообменной ВЭЖХ все олигонуклеотиды рехроматографировали на колонке с обращенной фазой. Анализ гомогенности осуществляли с помощью ПААГ, структуру синтетических или клонированных олигонуклеотидов подтверждали методом Максама — Гилберта [19].

Сравнение результатов синтеза с использованием MSNT и  $\text{PivCl}$  подтверждает данные о том, что  $\text{PivCl}$  — наиболее эффективный конденсирующий реагент [20], что становится очевидным при синтезе длинных последовательностей. Кроме того, тщательно очищенный и хранящийся под аргонном  $\text{PivCl}$  стабильнее MSNT. Тем не менее наши результаты показывают, что оба конденсирующих реагента в сочетании с полностью защищенными мономерами высокой степени чистоты позволяют эффективно и быстро проводить ручной синтез достаточно длинных олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

В работе использованы реагенты и растворители, описанные в работе [21]. Пиридин (extra pure), 1,2-дихлорэтан (extra pure) и ацетонитрил (for chromatography; Merck, ФРГ), очищали как описано в работе [22].  $\text{PivCl}$  (Fluka, Швейцария) очищали перегонкой над гидридидом кальция.

Для ВЭЖХ применяли растворители и соли, описанные в работе [21]. Для анионообменной ВЭЖХ использовали хроматограф Gilson (Франция), состоящий из насосов 303 с головками 10SC, инжектора 7125, аналитического смесителя 811А, манометрического модуля 802С, УФ-детектора 111В и контроллера градиента Apple Пс. Препаративную ВЭЖХ выполняли на том же хроматографе, оснащенном головками 25SC и препаративной кюветой детектора. Обратенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters (США), состоящем из насосов 501, инжектора У6К, детектора Lambda-Max, интегратора 740 и контроллера градиента 680. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке Zorbax ODS (10 мкм, 21,2 × 250 мм). Очистку олигонуклеотидов выполняли на колонках с широкопористыми сорбентами (300 А) Synchronak AX300 (6,5 мкм, 4,6 × 250 мм, Synchron, США) и Nucleosil 300-5-C18 (5 мкм, 4 × 250 мм, Macherey-Nagel, ФРГ). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-240 (Shimadzu, Япония).

N<sup>6</sup>-Бензоил-2'-дезоксаденозин, N<sup>4</sup>-бензоил-2'-дезоксцитидин, N<sup>2</sup>-изобутирил-2'-дезоксигуанозин, N<sup>2</sup>-изобутирил-О<sup>6</sup>-*n*-нитрофенилэтил-2'-дезоксигуанозин получали как описано в работе [23]. N<sup>6</sup>-*n*-Нитрофенилэтоксикарбонил-2'-дезоксаденозин, N<sup>4</sup>-*n*-нитрофенилэтоксикарбонил-2'-дезоксцитидин, O<sup>4</sup>-*n*-нитрофенилэтил-2'-дезокситимидин синтезировали по методу [12]. 5'-О-Диметокситритил-2'-дезоксинуклеозиды получены по методу [23].

*Защищенные 2'-дезоксинуклеозид-3'-гидрофосфиты (I)–(VIII)*. 1 ммоль защищенного по гетероциклическому основанию 5'-О-диметокситритилированного нуклеозида растворяли в 10 мл абс. ацетонитрила и последовательно добавляли 2 ммоль гексаэтилтриамидофосфита и 2 ммоль возогнанного тетразола. После 10 мин перемешивания добавляли 1 мл воды, через 4 ч смесь упаривали, прибавляли 20 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл). Экстракт сушили сульфатом натрия, остаток после упаривания растворяли в пиридине и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали, к остатку прибавляли 20 мл 1 М триэтиламмонийбикарбоната и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл). Экстракт сушили сульфатом натрия, упаривали до твердой пены. Полученное вещество сушили в высоком вакууме и хранили в атмосфере аргона. Выход 86–97%.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в 0,5-мл шприце со сменной иглой (Hamilton, Швейцария) или в ручном синтезаторе PS-100 (Cruachem, Великобритания). В качестве носителя использовали пористые стекла d-нуклеозид-Isaa-CPG (Cruachem) емкостью 27–32 мкмоль/г по нуклеозидному компоненту. В случае использования мономеров (I)–(IV) снятие олигонуклеотидов с носителя и деблокирование осуществляли раствором 70 мг *n*-нитробензальдоксима и 55 мкл N,N,N',N'-тетраметилгуанидина в смеси диоксан — вода, 1 : 1 (12 ч, 60° С), затем к раствору добавляли дополнительно 3 мл концентрированного раствора аммиака и выдерживали еще 6 ч при 60° С. При синтезе с мономерами (III)–(VIII) деблокировали 1 мл 0,5 М раствора 1,5,7-триазабидикло[4.4.0]дец-5-ена в пиридине (2–4 ч при 20° С), затем к раствору добавляли 3 мл концентрированного раствора аммиака и выдерживали дополнительно 6 ч при 60° С.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даныков Ю. В., Батчикова И. В., Скапцова Н. В., Бесидский Е. С., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 615–620.
2. Bridson P. K., Markiewicz W. I., Reese C. B. // J. Chem. Soc. 1977. V. 13. P. 447–448.
3. Reese C. B., Ubasawa A. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 23. P. 2265–2268.
4. Daskalov H. P., Sekine M., Hata T. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 33. P. 3899–3904.
5. Daskalov H. P., Sekine M., Hata T. // J. Chem. Soc. Japan. 1981. V. 54. № 10. P. 3076–3083.
6. Eadie J. C., Davidson D. S. // Nucl. Acids. Res. 1987. V. 15. № 20. P. 8333–8349.
7. Udea M. S., Ku L., Horn T., Gee Y. G., Warner B. D. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1985. V. 16. P. 257.

8. *Pon R. T., Damha M. J., Ogilvie K. K.* // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 18. P. 6447—6465.
9. *Kamimura T., Tsuchiya M., Koura K.* // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 27. P. 2715—2718.
10. *Kuzmich S., Marky L. A., Jones R. A.* // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 10. P. 3393—3404.
11. *Pistorius A. M. A., Claesen F. G. B., Kremer C. A. A., Rijk E. A. V., Tesser G. T.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1—2. P. 389—390.
12. *Himmelsbach F., Schulz B. S., Trichtinger T., Charubala R., Pjleiderer W.* // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 1. P. 59—73.
13. *Чернов Б. К., Голова Ю. Б., Поэмозова Г. Е.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1136—1138.
14. *Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
15. *Froehler B. C., Matteucci M. D.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1—2. P. 287—291.
16. *Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1—2. P. 283—286.
17. *Garegg P. G., Stawinski J., Stromberg R.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1—2. P. 425—427.
18. *Garegg P. G., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655—662.
19. *Mazam A. M., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
20. *Garegg P. G., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.* // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4056.
21. *Батчинова Н. В., Скапцова Н. В., Твардовская С. Е., Бесидский Е. С., Даныков Ю. В., Степанов А. И., Ажаев А. В.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 621—630.
22. *Spoat B. S., Gait M. J.* // Oligonucleotide Synthesis. A practical approach / Ed. Gait M. J. Oxford U. K.: IRL Press, 1984. P. 84—116.
23. *Jones R. A.* // Oligonucleotide Synthesis. A practical approach / Ed. Gait M. J. Oxford U. K.: IRL Press, 1984. P. 23—34.

Поступила в редакцию  
11.XI.1988

## H-PHOSPHONATE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES WITH THE USE OF THE *p*-NITROPHENYLETHYL BLOCKING GROUP

SCAPTSOVA N. V., KURKIN A. N., AZHAYEV A. V.

*All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow*

*p*-Nitrophenylethyl blocking group was used to protect the endocyclic imido groups of guanine and thymine nucleoside 3'-H-phosphonates employed in the H-phosphonate synthesis of a large number of oligodeoxyribonucleotides varying in length from 8 to 45 units. A combination of the fully protected monomers with a condensing agent, pivaloyl chloride or mesitylenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazole, provides a rapid and effective synthesis of long oligonucleotides.