



УДК 577.113.6

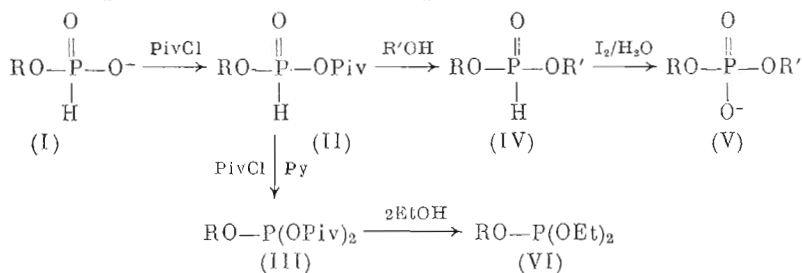
© 1990 г.

И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина, Д. М. Федоряк

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ВАРИАНТ ТВЕРДОФАЗНОГО Н-ФОСФОНАТНОГО МЕТОДА СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

*Институт биорганической химии и нефтехимии АН УССР,
Киев*

В последнее время широкое распространение получил Н-фосфонатный метод олигонуклеотидного * синтеза [1—4]. Его отличают простота, высокая скорость и эффективность. Однако методу присущи и некоторые недостатки. Важнейшим из них является снижение выхода продукта конденсации при проведении предварительной активации, т. е. когда нуклеозид-Н-фосфонат (I) определенное время взаимодействует с конденсирующим реагентом в отсутствие нуклеозидного компонента [1, 2, 5, 6]. Это связано с тем, что активный фосфорилирующий реагент — смешанный ангидрид (II) — в основной среде взаимодействует с избытком пивалоилхлорида с образованием диацилфосфита (III), в результате чего его концентрация в реакционной смеси быстро падает [5, 6]:

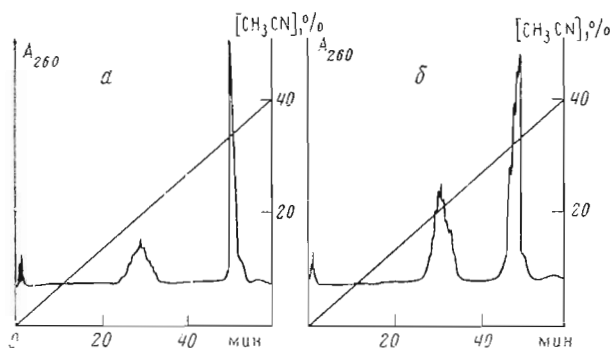


где $\text{R} = [(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}$; R' — остаток нуклеозида, связанного с носителем.

При этом часто наблюдается образование смеси олигомеров различной длины [2, 6]. В автоматическом варианте твердофазного синтеза вероятность предварительного смещения растворов Р-компонента и конденсирующего реагента в коммуникациях прибора заметно возрастает [2, 5, 6] и как следствие возрастает время предактивации. Этот нежелательный процесс в значительной степени устраняется поочередной подачей на полимерный носитель порций растворов нуклеозид-Н-фосфоната и PivCl. Однако не все модели синтезаторов представляют такую возможность. Это относится и к ряду отечественных приборов серий «Виктория» и «Ген».

В настоящем сообщении описывается вариант Н-фосфонатного метода, в котором эффективность синтеза практически не зависит от предактивации. Ранее в работе [6] было предложено использовать в Н-фосфонатной конденсации вместо пиридина (pK_a 5,2) хинолин (pK_a 4,8) с использованием поочередной подачи реагентов в реактор. При этом скорость конденсации остается столь же высокой, как и в пиридине, однако значительно снижается скорость образования диацилфосфита. Так, выход нуклеозиддиэтилфосфита (VI) (определен ТСХ), образующегося при взаимодействии

* Префикс «д» (дезокси) везде опущен. Сокращения: $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ — диметокситригил, Piv — пивалоил, Py — пиридин.



Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих олигонуклеотид $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Tr}(\text{Tr})_{13}\text{T}$, синтезированный с использованием хинолина (а) или пиридина (б), на колонке LiChrosorb RP-18 ($4,6 \times 120$ мм; Merck, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламинной ацетате (рН 8,0). Скорость потока 1 мл/мин

0,05 М $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T-PO}_2\text{H}$ с избытком этанола после 7 мин преактивации с 5 экв. PivCl в смеси ацетонитрил-хинолин (4 : 1), составил менее 20%, тогда как в присутствии пиридина превращение в (VI) за это время было практически полным. Поскольку выход в реакции конденсации в хинолине мало зависит от преактивации [6], такой вариант синтеза может применяться на синтезаторе любой конструкции.

Нами использован автоматический синтезатор «Виктория-4М» с циркуляционным контуром, на котором осуществлен синтез пентадекамера $(\text{Tr})_{14}\text{T}$. Конденсация проводилась в смеси ацетонитрил—хинолин (4 : 1). Последовательность операций синтетического цикла представлена в таблице. В качестве полимерного носителя использовали сферический силикагель «Силохром С-80», к которому нуклеозид присоединен через синтетический спейсер $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3-$ [7]. Емкость носителя составляет 25—35 мкмоль/г.

Олигонуклеотид получен со средним выходом 98,4% на стадию. После завершения наращивания олигонуклеотидной цепи проводили окисление гидрофосфорильных групп (2% I_2 в смеси пиридин—вода, 98 : 2; 10 мин) и аммонолиз (конц. NH_3 , 55° С, 1 ч). Эффективность синтеза подтверждена анализом реакционной смеси обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок а). При проведении синтеза $(\text{Tr})_{14}\text{T}$ в смеси ацетонитрил-пиридин (4 : 1) средний выход конденсации составляет лишь 94,1% на стадию, а ВЭЖХ показывает образование смеси олигонуклеотидов различной длины, несущих $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -группу на 5'-конце (рисунок, б). Как показано ранее [6], это связано с неполнотой фосфорилирования ОН-компонента и одновременно с недостаточной ацилирующей активностью PivCl , что приводит к образованию олигомеров, содержащих пропуски звеньев. Такой результат свидетельствует о малоприспособности синтезатора «Виктория-4М».

Последовательность операций одного цикла наращивания олигонуклеотидной цепи

Операция	Реагент или растворитель	Время, мин *
Промывка	Дихлорметан	0,5
Детритилирование	1% CF_3COOH в дихлорметане	1
Промывка	Ацетонитрил	0,5
»	Ацетонитрил — хинолин (4 : 1)	1
Конденсация **	Реакционная смесь	2,5
Промывка	Ацетонитрил — хинолин (4 : 1)	1
»	Ацетонитрил	0,5

* Скорость потока 2 мл/мин.

** 200 мкл 0,05 М $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T-PO}_2\text{H}$ и 200 мкл 0,25 М PivCl в смеси ацетонитрил — хинолин (4 : 1) поступают в смеситель, после чего реакционная смесь циркулирует через реактор с полимерным носителем.

как и других моделей, в которых осуществляется предварительное смешение растворов Р-компонента и конденсирующего реагента, для проведения Н-фосфонатного синтеза в стандартных условиях, т. е. в пиридине. В то же время при использовании смеси ацетонитрил — хинолин конденсация проходит с высокой эффективностью даже в условиях длительной преактивации.

Таким образом, предложенный вариант твердофазного Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов универсален, пригоден для любых моделей автоматических синтезаторов, так как позволяет практически исключить влияние нежелательных процессов стадии активации на эффективность синтеза. Этим методом получен ряд олигонуклеотидов длиной до 20 звеньев для целей генетической инженерии со средним выходом порядка 97,5—98,5% на стадию. Олигонуклеотиды выделяли как описано в работе [6]. В настоящее время нами ведется работа по оптимизации метода для синтеза более протяженных олигонуклеотидов.

Авторы благодарят В. А. Ефимова (ИБХ АН СССР) за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // *Chem. scr.* 1986. V. 26. № 1. P. 59—62.
2. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4054.
3. Froehler B. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
4. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
5. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1987. V. 6. № 3. P. 655—662.
6. Ефимов В. А., Дубей И. Я. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. № 2. С. 211—218.
7. Deutsch J., Cohen S., Weisz M., Katzhendler J. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1986. V. 5. № 3. P. 325—330.

Поступило в редакцию
26.III.1990

I. YA. DUBEY, T. V. LYAPINA, D. M. FEDORYAK

AN EFFICIENT VARIANT OF THE SOLID PHASE H-PHOSPHONATE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

*Institute of Bioorganic and Oil Chemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

An efficient variant of the H-phosphonate method of the oligonucleotide synthesis is described. It is based on the use of acetonitrile — quinoline (4 : 1) mixture as the condensation reaction medium, where the rate of the bis-acylphosphite formation is significantly lower than in pyridine mixtures, thus eliminating the negative effect of preactivation of the P-component on the synthesis efficiency. Pentadecamer (Tp)₁₄T was obtained in a high yield at the Victoria-4M automatic synthesizer using a Silochrom S-80 based polymer support.