



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 17 \* № 2 \* 1991

УДК 547.963.32.057:577.113

© 1991 г.

*В. В. Самошин, Ю. Е. Худяков, В. Д. Смирнов*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВРЕМЕННОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ ПРИ СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НЕПРИРОДНОЙ СВЯЗЬЮ

*Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва*

Блокирование на определенных стадиях Н-фосфонатного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов межнуклеотидных атомов фосфора алcoxигруппами предотвращает взаимодействие этих атомов с аминами, ведущее к образованию неприродных аналогов олигонуклеотидов с фосфамидными связями. Комбинация обработок синтезируемого олигонуклеотида первичными спиртами и аминами позволяет получать олигонуклеотиды с любым заданным положением неприродных фосфамидных связей.

Развитие методов химического синтеза олигонуклеотидов позволило молекулярным биологам значительно расширить круг задач, в решении которых они могут использовать наряду с природными синтетическими фрагментами ДНК их неприродные аналоги [1, 2].

С химической точки зрения синтез соединений, содержащих одну или несколько неприродных групп, связанных с межнуклеотидным атомом фосфора, не отличается от обычного олигонуклеотидного синтеза и может быть осуществлен на основе как фосфотриэфирного, так и фосфитамидного методов синтеза. Однако и в том и другом случаях требуется предварительно синтезировать помимо четырех немодифицированных нуклеотидов столько же нуклеотидов, содержащих соответствующую группу атомов, не встречающуюся в природных нуклеотидах [3, 4].

Появление Н-фосфонатной методики синтеза олигонуклеотидов [5—7] привело к тому, что возникла возможность вводить неприродные межнуклеотидные группы непосредственно на соответствующих стадиях синтеза олигонуклеотида [8, 9]. Правда, в этом случае исчезает возможность введения неприродных групп в строго заданную позицию в олигонуклеотиде, а также синтеза соединений, в которых эти группы были бы разделены областью природных связей, что ограничивает сферу применения таких веществ.

В настоящей работе предлагается способ, который свободен от указанных выше ограничений и позволяет, оставаясь в рамках Н-фосфонатного метода синтеза, получать олигонуклеотиды, содержащие произвольное число фосфамидных межнуклеотидных связей в строго заданных (произвольных) положениях.

Известно, что Н-фосфонатная межнуклеотидная связь стабильна в условиях олигонуклеотидного синтеза [5, 6] и атом водорода является своего рода постоянной «защитной группой» для межнуклеотидного атома фосфора. Образующаяся в процессе синтеза олигонуклеозидная цепь содержит диэфиры гидрофосфористой кислоты, которые по завершении синтеза можно превратить либо в природные фосфодиэфиры, либо, обработав олигонуклеозид в определенных условиях амином или спиртом, получить соответствующие фосфамидные или фосфотриэфирные производные [8].

При этом известно, что фосфамидная связь устойчива как в условиях химического синтеза олигонуклеотидов, так и при их выделении. Напротив, алcoxипроизводные, которые стабильны в условиях олигонуклео-

Сокращения: MeIm — 1-метилимидазол, PivCl — пивалоилхлорид, CPG — стекла с контролируемым размером пор.

тидного синтеза, при выделении олигонуклеотида гидролизуются с образованием фосфодиэфирных групп [10] и, таким образом, аллоксигруппы могут служить временной защитой для межнуклеотидного атома фосфора.

Осуществляя синтез олигонуклеотидов Н-фосфонатным методом, мы проводили временное блокирование аллоксигруппами тех межнуклеотидных Н-фосфонатных связей, которые в конечном итоге необходимо было сохранить нативными. В тех же участках, которые предполагалось необратимо модифицировать, после стадии наращивания цепи на одно или несколько (исходя из конкретной задачи) звеньев проводили обработку алкиламином, необратимо меняющую характер фосфатной группы.

Синтез с использованием 3'-гидрофосфитов нуклеозидов начинается с 3'-конца олигонуклеотида и ведется до того места, в котором предполагается расположить неприродную межнуклеотидную связь. Фрагмент цепи, синтезированный до этого места, обрабатывается метанолом, после чего синтез олигонуклеотида продолжается и проводится столько стадий конденсации, сколько неприродных связей имеется в виду создать в данной области молекулы. После этого вновь образованные Н-фосфонатные межнуклеотидные связи обрабатывают соответствующим амином и синтез олигонуклеотида продолжается. Если необходимо ввести дополнительные неприродные связи, отделенные от предыдущих областью природных связей, Н-фосфонатный предшественник этой области обрабатывают метанолом с последующим присоединением одного или нескольких 3'-гидрофосфитов нуклеозидов и их обработкой соответствующим амином. Дальнейший синтез олигонуклеотида продолжают либо стандартным методом (если используют автоматический синтезатор), либо по адаптированной для неавтоматизированного синтеза процедуре (см. «Экспериментальную часть»). Отщепление олигонуклеотида от твердого носителя, удаление защитных групп с межнуклеотидных фосфатов и гетероциклов проводится по методу [10].

По приведенной схеме нами были синтезированы олигонуклеотиды длиной от 15 до 21 основания, содержащие от 2 до 11 фосфометиламидных или фосфоморфолидных связей. Синтезы проводили в ручном варианте в колонке со стеклянным фильтром на твердом носителе в масштабе 0,1—0,2 мкм. Растворы нуклеозид-3'-гидрофосфитов и конденсирующего реагента (0,20—0,25 М 3'-гидрофосфит и 1,00—1,25 М PivCl в смеси ацетонитрила и пиридина) смешивали непосредственно в колонке с носителем и перемешивали 50—60 с.

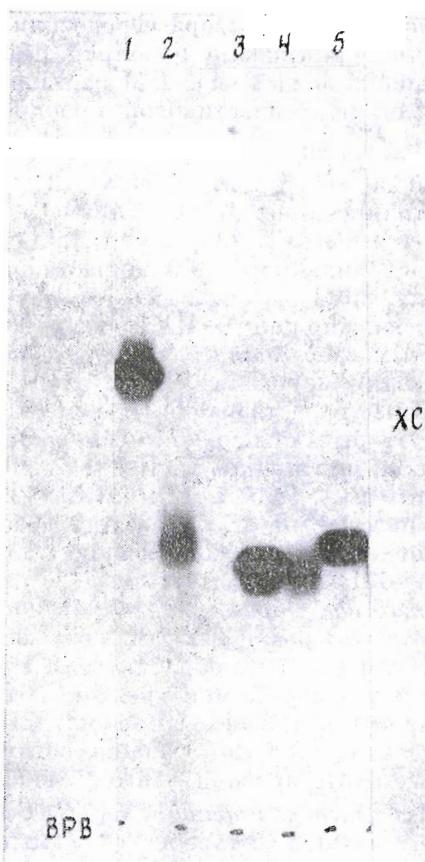
Для временной защиты межнуклеотидных фосфатов использовали раствор метанола в смеси 1-метилимидазол — триэтиламин — четыреххlorистый углерод, а для образования фосфамидных связей — раствор соответствующего амина в смеси пиридин — четыреххlorистый углерод [8]. Окисление Н-фосфонатных связей проводили по методике [7]. Отщепление метоксигруппы от межнуклеотидных фосфатов, деблокирование эзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований, а также снятие олигонуклеотида с твердого носителя осуществляли в соответствии с работой [10]. Олигонуклеотиды выделяли препаративным гель-электрофорезом.

Как было показано в работе [6], введение в состав олигонуклеотида фосфамидных межнуклеотидных связей вызывает изменение их электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле.

Гидролиз фосфамидных связей приводит к восстановлению «нормальной» подвижности в геле. Этот эффект позволяет подтвердить наличие фосфамидных связей в молекуле олигонуклеотида. Поскольку было замечено [9], что обработка фосфамидных связей 85 % муравьиной кислотой [6] вызывает нежелательный гидролиз гликозидных связей пуриновых дезоксинуклеотидов, мы, вслед за авторами работы [9], для подтверждения наличия фосфамидных связей в молекуле олигонуклеотида проводили их селективное расщепление изоамилнитритом.

Из авторадиограммы очищенного олигонуклеотида, содержащего фосфамидные связи, и того же олигонуклеотида после обработки изоамилнитритом (рисунок) видно, что после такой обработки восстанавливается

1 2 3 4 5



Радиоавтограмма электрофоретического разделения в 20% ПААГ (7 М мочевина) очищенных олигонуклеотидов *P* (1) и *E* (5) и этих же олигонуклеотидов после обработки изоамилнитритом (соответственно дорожки 2 и 4). 3 — контрольный 18-мер. *E*: 5' CTTCCCTGCCT\*T\*TTTGCA, *P*: 5' CCTCTGCCT\*T\*C\*A\*C\* \*C\*T\*C\*T\*G\*C\*CC, где \* — фосфамидная межнуклеотидная связь. ХС и ВРВ — положение красителей ксилинцианола и бромфенолового синего

«нормальная» электрофоретическая подвижность олигонуклеотида, нарушенная (дорожки 1 и 5) из-за наличия неизаряженных фосфамидных групп. Характер изменения подвижности олигонуклеотидов, представленных на рисунке, свидетельствует о том, что в составе синтезированных по предложенной нами методике олигонуклеотидов содержатся фосфамидные межнуклеотидные связи.

Таким образом, временная защита межнуклеотидных связей с помощью метоксигруппы позволяет И-фосфонатным методом синтезировать олигонуклеотиды с произвольным числом неприродных межнуклеотидных связей, расположенных в строго определенных положениях внутри молекулы.

### Экспериментальная часть

Пиридин (Fluka, Швейцария) и триэтиламин (Merck, ФРГ) абсолютизовали над KOH и СаН<sub>2</sub>, ацетонитрил (Fluka), метиленхлорид (Fluka) и четыреххлористый углерод (СССР) — над Р<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и СаН<sub>2</sub>. Для абсолютизирования метанола (СССР) использовали смесь магниевых стружек и кристаллического иода. Пивалоилхлорид (Sigma, США) и морфолин (Aldrich, США) перегоняли при атмосферном давлении. 1-Метилиимидазол (Merck, ФРГ) перегоняли в вакууме (10 мм рт. ст.), использовали фракцию с т. кип. 103—105° С. Уксусную кислоту (СССР) перегоняли при атмосферном давлении. Трихлоруксусную кислоту (Fluka) использовали без дополнительных обработок. Изоамилнитрит синтезировали по [11].

Синтез олигонуклеотидов проводили в стеклянной колонке (внутренний диаметр 4 мм, высота 30 мм) с пористым фильтром. В качестве твердого носителя использовали СРГ 500 (Sigma) с нагрузкой 40—50 мкм/г. 3'-Гидрофосфиты нуклеозидов синтезировали по методу [7] и перед использованием сушили упариванием (3 × 500 мкл) с абс. MeCN, после чего растворяли в смеси абс. пиридина и MeCN (1 : 1 по объему). По 20 мкл

полученного 0,2 М раствора переносили в соответствующим образом маркированные пластиковые пробирки объемом 100 мкл.

Пивалоилхорид в виде 1 М раствора в смеси абс. пиридина и MeCN (1 : 1) хранили в пластиковой пробирке (Eppendorf, ФРГ).

#### Цикл синтеза:

- 1) промывка носителя: MeCN ( $3 \times 1$  мл),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 1$  мл),
- 2) детритилирование: 2,5%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 1$  мл), 50–60 с,
- 3) промывка:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 1$  мл), пиридин — MeCN; 1 : 1 ( $3 \times 1$  мл),
- 4) конденсация: 20 мкл 0,2 М раствора нуклеозид-3'-гидрофосфита, затем 20 мкл 1,0 М раствора PivCl, 50–60 с,
- 5) промывка: пиридин — MeCN, 1 : 1 ( $2 \times 1$  мл), затем  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 1$  мл).

Для временной защиты межнуклеотидных фосфатов колонку с навеской CPG вакуумировали (3 мин, 10 мм рт. ст.), после чего вносили в колонку 1 мл 10% раствора MeOH в смеси MeIm —  $\text{Et}_3\text{N}$  —  $\text{CCl}_4$  (5 : 5 : 90). Колонку закрывали пробкой и выдерживали при легком перемешивании в течение 30 мин при 20° С. После этого промывали носитель на колонке абсолютным  $\text{CCl}_4$  ( $2 \times 1$  мл),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 1$  мл) и вакуумировали носитель (3 мин, 10 мм рт. ст.). Затем возобновляли синтетический цикл и проводили несколько конденсаций с использованием соответствующих нуклеозид-3'-гидрофосфитов.

Для перевода образовавшихся межнуклеотидных Н-фосфонатных связей в соответствующие фосфамидные носитель на колонке вакуумировали (3 мин, 10 мм рт. ст.) и обрабатывали 1 мл смеси амин — пиридин —  $\text{CCl}_4$  (1 : 5 : 5) в течение 20 мин при 20° С. По истечении времени реакции носитель промывали ( $\text{CCl}_4$ ,  $2 \times 1$  мл,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $2 \times 1$  мл) и возобновляли синтетический цикл до 5'-конца синтезируемого олигонуклеотида. По этой схеме синтезировали олигонуклеотиды Е и Р (рисунок).

*Синтез олигонуклеотида 2N (5'GACGG\*CCAGTGCCA\*AGCTTGG)*, содержащего в своем составе две фосфамидные связи, разделенные областью фосфодиэфирных связей, был проведен следующим образом. После первых 6 циклов синтеза обрабатывали навеску CPG 10% раствором MeOH в смеси MeIm —  $\text{Et}_3\text{N}$  —  $\text{CCl}_4$  (5 : 5 : 90) 30 мин при 20° С, тем самым вводя временную защитную группу в межнуклеотидные фосфаты. Затем присоединяли очередной нуклеозид-3'-гидрофосфит, после чего обрабатывали навеску CPG 10% раствором морфолина в смеси пиридин —  $\text{CCl}_4$  (1 : 1) 20 мин при 20° С.

Этой обработкой формировалась первая фосфоморфолидная связь, которая после завершения синтеза будет отделена от 3'-конца олигонуклеотида областью, состоящей из 6 фосфодиэфирных связей. Затем возобновили синтетические циклы и осуществляли еще 8 конденсаций соответствующих нуклеозид-3'-гидрофосфитов, провели защиту вновь образованных межнуклеотидных Н-фосфонатных связей, обработав навеску CPG 10% раствором MeOH в смеси MeIm —  $\text{Et}_3\text{N}$  —  $\text{CCl}_4$  (5 : 5 : 90) в течение 30 мин.

Для формирования второй фосфоморфолидной межнуклеотидной связи провели конденсацию нуклеозид-3'-гидрофосфита и образовавшуюся межнуклеотидную Н-фосфонатную связь перевели в фосфоморфолидную, обработав навеску CPG 10% раствором морфолина в смеси пиридин —  $\text{CCl}_4$  (1 : 1) в течение 20 мин при 20° С. После этого продолжили олигонуклеотидный синтез до 5'-конца молекулы.

Окисление межнуклеотидных Н-фосфонатных связей проводили по методу [7].

*Деблокирование и выделение олигонуклеотидов.* Навеску CPG переносили в 1,5-мл пластиковую пробирку (Eppendorf), добавляли 500 мкл концентрированного водного раствора аммиака и термостатировали в стальной «бомбе» при 55° С в течение 18 ч. Суспензию фильтровали через силиконизированную стекловату (Serva, ФРГ), промывали фильтр смесью 0,05 М TEAB (pH 8) — EtOH (1 : 1),  $2 \times 500$  мкл, раствор упаривали (SPEED VAC SVC-100H, SAVANT, США), осадок растворяли в 200 мкл воды и осаждали 7-кратным объемом 2%  $\text{NaClO}_4$  в ацетоне (20 мин,

14 000 об/мин). Осадок промывали ацетоном и после удаления следов растворителя (SPEED VAC) растворяли в 100 мкл воды.

Препаративное выделение олигонуклеотидов проводили электрофорезом в ПААГ по методу, изложенному в работе [12].

*Гидролиз фосфамидных связей.* Олигонуклеотиды радиоактивно метили с помощью [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATР (Amersham, Англия) и Т4-полинуклеотидкиназы (Pharmacia, Швеция). Для этого инкубировали при 37° С в течение 30 мин смесь 40 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ хлорида магния, 5 мМ дитиотреита, 5 ед. Т4-полинуклеотидкиназы, 5 мкМ олигонуклеотида, 5 мкМ [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATР. Общий объем смеси 10 мкл.

Радиоактивно меченные образцы осаждали 10-кратным объемом охлажденного EtOH (8 мин, 14 000 об/мин). Декантировали спирт и обрабатали осадок 600 мкл 10% изоамилнитрита в смеси H<sub>2</sub>O — CH<sub>3</sub>COOH — EtOH (1 : 4 : 5) [9]. Реакционную смесь термостатировали при 45° С в течение 5 ч, разбавляли 1 мл воды и экстрагировали последовательно (3 × 1 мл) диэтиловым эфиром, этилацетатом и вновь диэтиловым эфиром. Отбирали водную фазу и после лиофилизации растворяли осадок в смеси, содержащей 80% формамида, 1 мМ EDTA, 0,1% ксиленцианола и 0,1% бромфенолового синего. Образцы анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевину.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith C., Aurelian L., Reddy M., Miller P., Ts'o P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 9. P. 2787—2791.
2. Agrawal S., Goodchild J., Civeira M., Thornton A., Sarin P. S., Zamecnik P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 19. P. 7079—7083.
3. Miller P., Reddy M., Murakami A., Blake K., Lin S.-B., Agris C. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 18. P. 5092—5097.
4. Agrawal S., Goodchild J. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 31. P. 3539—3542.
5. Garegg Per J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Chem. scr. 1985. V. 25. № 3. P. 280—282.
6. Froehler B., Matteucci M. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
7. Froehler B., Ng P., Matteucci M. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
8. Froehler B. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 46. P. 5575—5578.
9. Froehler B., Ng P., Matteucci M. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4831—4839.
10. Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach / Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 69.
11. Органикум. Практикум по органической химии. Кол. авт. Пер. с нем. М.: Мир, 1979. С. 233.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрюк Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 175.

Поступила в редакцию  
30.I.1990

После доработки  
12.IV.1990

V. V. SAMOSHIN, Yu. E. КЧУДЫАКОВ, V. D. SMIRNOV

#### A TEMPORARY PROTECTING GROUP FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING MODIFIED INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Methoxygroup has been used for transient P-protection on H-phosphonate oligonucleotide synthesis. Whereas other H-phosphonate linkages can be irreversibly transformed into phosphoramidates by treatment with alkylamines, the protected phosphoralkoxyl groups generate natural phosphodiester linkages after the final deprotection. The method allows for synthesis of oligonucleotides with addressed position of internucleotide phosphoralkylamidate groups.