БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
Том 18 * № 4 * 1992

УДК 577.113.6

© 1992 г. *И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина, Д. М. Федоряк*

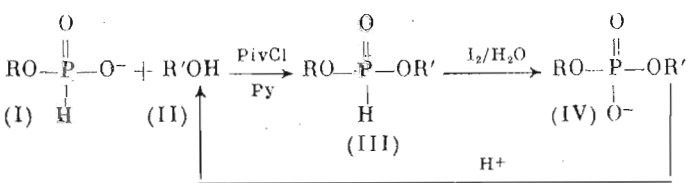
СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ В РАСТВОРЕ

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Предложен новый метод Н-фосфонатного синтеза олигонуклеотидов в растворе, основанный на окислении неустойчивых Н-фосфонатных диэфиров без их выделения водным иодом с последующей очисткой фосфодиэфирных продуктов при помощи обращенно-фазовой хроматографии на ТМС-силикагеле. Эффективность метода подтверждена на примере получения октануклеотида d(GGAATCC); при постадийном наращивании цепи выходы составляли 60–95% на стадию.

Н-Фосфонатный метод широко используется для синтеза олигонуклеотидов на полимерном носителе [1, 2]. Однако для синтеза в растворе он не применяется, поскольку продукты конденсации – динуклеозид-Н-фосфонаты – гидролитически неустойчивы [1, 3] и в процессе выделения и очистки в значительной степени расщепляются.

В настоящей работе предлагается метод Н-фосфонатного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов в растворе, основанный на окислении неустойчивых промежуточных диэфиров фосфористой кислоты перед их выделением.



R = (DMTr)T-, R′ = T(Bz) (а), -TpT(Bz) (б)

Синтетическая схема включает в себя конденсацию нуклеозид-Н-фосфоната (I) с нуклеозидным компонентом (IIа) в пиридине в присутствии пивалоилхлорида (PivCl) и окисление образовавшегося диэфира (IIIа) водным иодом непосредственно в реакционной смеси. Устойчивый продукт (IVа) выделяют, детритилируют и полученный таким образом фосфодиэфир (IIб) используют в качестве ОН-компонента в следующей конденсации. По данным ^{31}P-ЯМР-спектроскопии, фосфодиэфирная группа в динуклеотиде (IVа) не фосфорилируется активированным нуклеозид-Н-фосфонатом [4].

Это подтверждено нами при синтезе октануклеотида $(Tp)_7T$ твердофазным Н-фосфонатным методом в двух вариантах – стандартном и с дополнительной стадией окисления гидрофосфорильной группы водным I_2 после каждой конденсации. Хроматографический и электрофоретический анализ двух образцов дал практически идентичные картины (рис. 1).

Используемые сокращения: DMTr – диметокситритил, Piv – пивалоил, ТМС-силикагель – триметилсилилированный силикагель, Py – пиридин. Префикс «d» в обозначении дезоксинуклеотидов опущен.

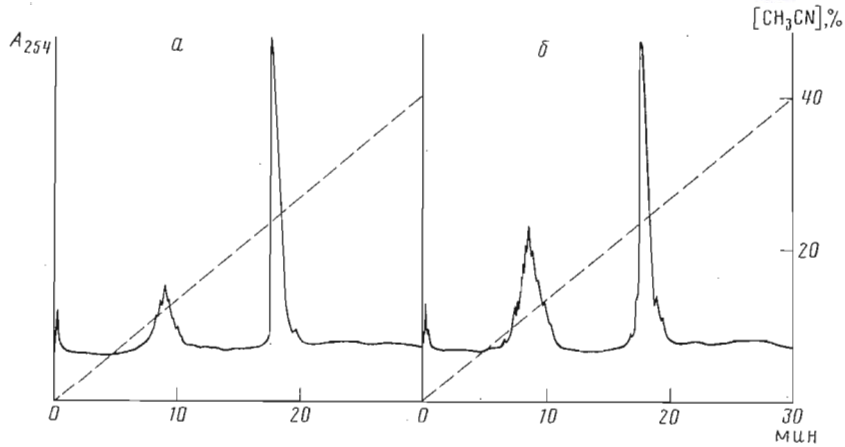


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих октануклеотид (DMTr)(Tp)$_7$T, полученный твердофазным H-фосфонатным методом в стандартном варианте (*а*) и с окислением после каждой конденсации (*б*)

Во втором варианте синтеза выходы реакций конденсации, определенные по отщеплению диметокситритильного катиона, были несколько ниже (96—98 и 93—96% соответственно) и не наблюдалось увеличения количества отщепленных DMTr-групп от стадии к стадии. Следовательно, активированный нуклеозид-H-фосфонат практически не реагирует с фосфодиэфирными группами и их присутствие в олигонуклеотидной цепи лишь незначительно влияет на эффективность H-фосфонатной конденсации. Не наблюдалась также реакция фосфодиэфирной группы в соединении (IVa) со спиртом в пиридине в присутствии PivCl по крайней мере в течение 1 ч. Таким образом, предложенная схема может быть использована для осуществления синтеза олигонуклеотидов в растворе, что доказано на примере получения пентамера (Tp)$_4$T и октамера GGAATTCC (линкер *Eco*RI).

Для конденсации в пиридине обычно использовали 1,3—1,6 экв. H-фосфоната относительно нуклеозидного компонента и 5—6 экв. PivCl относительно P-компонента. Для контроля за полнотой протекания реакции аликвоту реакционной смеси окисляли водным иодом и анализировали при помощи ТСХ. Достаточно эффективное разделение реакционной смеси достигается на пластинках силикагеля при использовании в качестве элюента смеси изопропанол — конц. NH_3 — вода (как известно, такой подход используется для выделения полностью деблокированных олигонуклеотидов [5]). Продукт конденсации без выделения окисляли иодом в водном пиридине. Образующиеся фосфодиэфиры (IV) выделяли при помощи обращенно-фазовой хроматографии на ТМС-силикагеле. Эффективное отделение тритилированного продукта от непрореагировавшего OH-компонента и других составляющих реакционной смеси достигается при использовании градиента диоксана (30—80%) в 0,05—0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рис. 2*а*). Для облегчения очистки избыток P-компонента отделяли перед хроматографией экстракцией водной реакционной смеси хлороформом, причем фосфодиэфирные блоки протяженностью три и более звеньев практически не экстрагируются; с этой же целью в первой конденсации целесообразно использовать избыток OH-компонента. Для очистки блоков длиной до 5—6-звенных вместо хроматографии может быть использован с достаточной эффективностью удобный «экстракционный метод» [6]: после отделения P-компонента продукт конденсации экстрагируют из водного раствора смесью

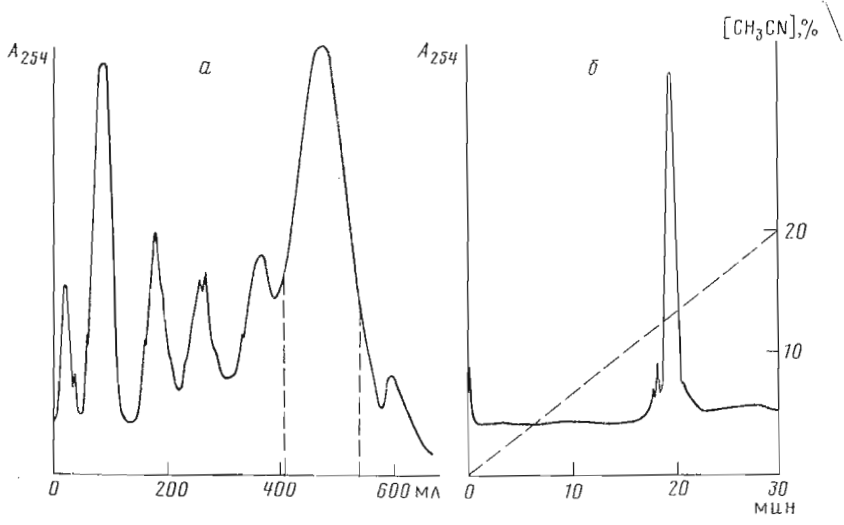


Рис. 2. Хроматография продуктов реакции, полученных при синтезе октануклеотида GGAATTCC: *а* – обращенно-фазовая хроматография реакционной смеси, содержащей защищенный олигонуклеотид (DMTr)ibGpibGpbzApbzApTpTpbzCpbzC(Bz) на ТМС-силикагеле. Колонка 30×150 мм, градиент диоксана (30–80%) в 0,1 М триэтиламмонийацетате, скорость элюции 5 мл/мин. Выделенная фракция обозначена штриховой линией; *б* – анализ полностью деблокированного олигонуклеотида GGAATTCC (выделенного согласно рис. 2*а*) обращенно-фазовой ВЭЖХ

хлороформ – бутанол (20–50% последнего, в зависимости от длины блока); при этом ОН-компонент, не содержащий DMTr-группы, остается в водной фазе.

Выделенный продукт (IV) обрабатывали 80% уксусной кислотой. Выходы нуклеотидных блоков (II) после детритилирования составляли 60–95%, снижаясь с ростом длины цепи.

После стандартного деблокирования (обработка конц. NH_3 и затем 80% CH_3COOH) целевой олигонуклеотид выделяли обращенно-фазовой хроматографией на ТМС-силикагеле и на этом же носителе проводили обессоливание согласно [7]. Чистоту полученных олигонуклеотидов подтверждали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2*б*) и электрофорезом в полиакриламидном геле. Полученные результаты свидетельствуют о том, что олигонуклеотиды, синтезированные предложенным методом, достаточно чистые, а их характеристики не отличаются от таковых для олигонуклеотидов, полученных стандартным твердофазным Н-фосфонатным методом.

Таким образом, описанный метод, сочетающий черты Н-фосфонатного (который можно определить как фосфитдиэфирный) и фосфодиэфирного подходов, позволяет успешно синтезировать значительные количества коротких олигонуклеотидов. В настоящее время нами исследуется возможность применения предложенной методологии для синтеза в растворе тио- и фосфамидных аналогов олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы защищенные нуклеозиды (Биолар, СССР), акриламид, N,N′-метилен-бис-акриламид, трис (Reanal, Венгрия), пивалоилхлорид, ацетонитрил для ВЭЖХ (Merck, ФРГ). Остальные реагенты и растворители – отечественного производства. Пиридин перегоняли над нингидрином и CaH_2. Н-Фосфонаты нуклеозидов получали согласно [1]. ТСХ проводили на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck) в системах

$CHCl_3$ – MeOH (9 : 1) (А) и изопропанол – конц. NH_3 – H_2O (7 : 2 : 1) (Б). ТМС-Силикагель получали из силикагеля Kieselgel 60 (Fluka, Швейцария) согласно [7]. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе FPLC System (Pharmacia, Швеция) на колонке HR 5/2 с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (pH 7,5) со скоростью элюции 0,5 мл/мин.

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили на носителе на основе силикагеля [8] стандартным H-фосфонатным методом с проведением конденсаций в смеси CH_3CN – Py (4 : 1) в ручном варианте [9]. Во втором варианте синтеза после каждой конденсации дополнительно проводили окисление 2% I_2 в смеси Py – H_2O (98 : 2) в течение 5 мин.

Типовая методика проведения конденсации при синтезе в растворе. 0,1 ммоль OH-компонента типа (II) и 0,13–0,13 ммоль нуклеозид-H-фосфоната дважды упаривали с пиридином, растворяли в 1 мл пиридина и прибавляли PivCl (5–6 экв. относительно нуклеотидного компонента). Для контроля за полнотой протекания реакции аликвоту реакционной смеси (20–30 мкл) окисляли в течение 5 мин, добавляя двойной объем 5% I_2 в смеси Py – H_2O (95 : 5), и анализировали ТСХ в системе Б. Через 10–15 мин в реакционную среду добавляли раствор 0,5 ммоль I_2 в 3 мл смеси Py – H_2O (95 : 5); спустя 10–20 мин разбавляли в 2 раза 0,5 М TEAB и нейтрализовали избыток I_2, прибавляя по каплям раствор $Na_2S_2O_3$ до обесцвечивания. После экстракции $CHCl_3$ (3×3 мл) экстракт промывали 0,5 М TEAB, водные слои объединяли, наносили на колонку с ТМС-силикагелем и хроматографировали в градиенте диоксана (30–80%) в 0,05–0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере. Фракцию, содержащую продукт (IV), упаривали в вакууме, остаток растворяли в 5 мл 80% HOAc и через 15–20 мин упаривали. После двукратного упаривания с водой продукт растворяли в 2 мл H_2O, экстрагировали эфиром (3×2 мл) и обессоливали на ТМС-силикагеле согласно [7]. Выходы нуклеозидных компонентов типа (II) составляли 60–95%.

Деблокирование и выделение целевого олигонуклеотида. После хроматографического выделения 5′,3′-O,N-защищенный целевой олигонуклеотид типа (IV) обрабатывали 5 мл конц. NH_3 (ночь при 55° С). Смесь упаривали, остаток растворяли в 5 мл 80% CH_3COOH и спустя 20 мин упаривали. После двукратного упаривания с водой целевой олигонуклеотид растворяли в 2 мл воды, экстрагировали эфиром (3×2 мл) и выделяли хроматографией на ТМС-силикагеле согласно [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399–5407.
2. *Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C.* // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051–4054.
3. *Kume A., Fujii M., Sekine M., Hata T.* // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2139–2143.
4. *Грязнов С. М., Потапов В. К.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1419–1422.
5. *Wu R., Wu N., Hanna Z., Georges F., Narang S.* // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach / Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 137–138.
6. *Kuang D.* // Nucl. Acids Res. Sympos. Ser. 1980. № 7. P. 89–98.
7. *Калашников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 666–672.
8. *Дубей И. Я., Ляпина Т. В., Федоряк Д. М.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1574–1576.
9. *Ефимов В. А., Дубей И. Я.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 211–218.

Поступила в редакцию
14.VIII.1991

После доработки
22.X.1991

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

H-PHOSPHONATE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS IN SOLUTION

Institute of Bioorganic and Oil Chemistry,
Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

A new method of H-phosphonate oligonucleotide synthesis in solution is described based on the oxidation of unstable H-phosphonate diesters, without their isolation, with aqueous iodine followed by the purification of the phosphodiester products using reverse-phase chromatography on TMS-silica. Octanucleotide d(GGAATTCC) was synthesized by the suggested method with the step-by-step chain elongation; yields were 60–95%.