



УДК 577.113.6

© 1993 В. А. Коршун, Е. В. Ножевникова,
Ю. А. БерлинНОВЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ФОСФАМИДИТНОГО СИНТЕЗА
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, МЕЧЕННЫХ БИОТИНОМ*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва*

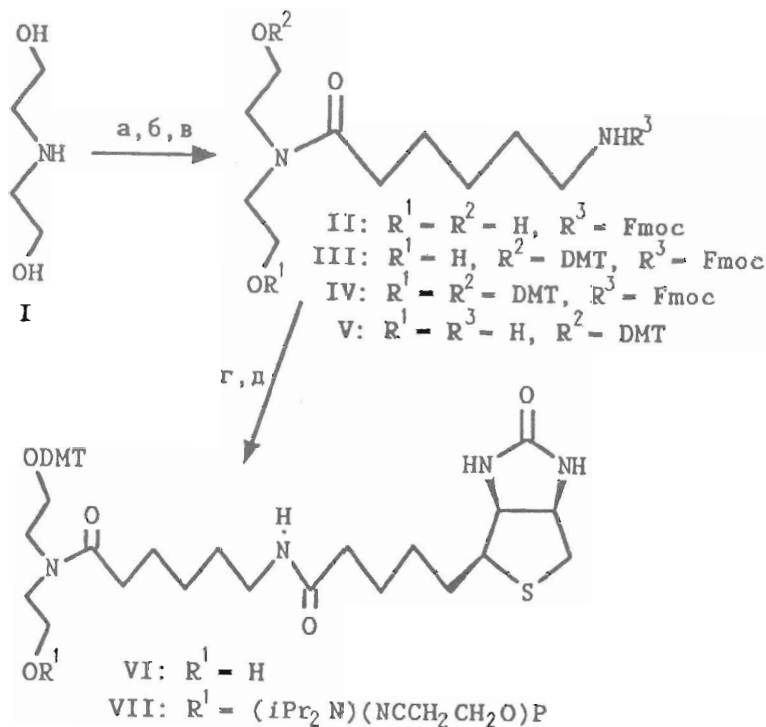
Биотин, благодаря уникальной способности образовывать чрезвычайно устойчивые комплексы со стрептавидином и родственными белками, находит многообразное применение в качестве нерадиоактивной метки при изучении различных биохимических процессов [1]. Особенно широко используются меченные биотином олиго- и полинуклеотиды [2], являющиеся эффективными инструментами молекулярно-биологических исследований и медико-генетической диагностики [3].

Остатки биотина могут быть введены в различные положения молекулы олигонуклеотида прямым ацилированием по модифицирующим алифатическим аминокетильным группам [4] или же в ходе синтеза (биохимического или чисто химического) — с использованием в качестве одного из предшественников (т. е. мономерных звеньев) биотинсодержащего 5'-трифосфата нуклеозида [5] или нуклеозидного 3'-фосфамидита [6, 7].

Чтобы уменьшить вероятность влияния биотинсодержащих остатков на гибридизационные свойства олигонуклеотида, в ряде случаев представляется целесообразным, не затрагивая оснований, вводить остаток биотина не в промежуточное, а в концевое положение цепи. Концевую модификацию олигонуклеотида (чаще речь идет о 5'-положении, что сохраняет для нуклеотидной цепи возможность ферментативной элонгации) удобно осуществлять с помощью ненуклеотидного реагента, содержащего как биотиновый остаток, так и фосфорилирующую группировку [8—11]. Синтез ранее описанных реагентов такого рода довольно громоздок. В настоящем сообщении представлен простой синтез нового биотинилирующего реагента для фосфамидитного олигонуклеотидного синтеза.

Исходным соединением явился диэтанолламин (I), в котором гидроксилы моделируют 5',3'-диольную группировку дезоксирибонуклеозида, а азот служит якорным атомом для введения остатка биотина в молекулу будущего реагента (см. схему). По этому азоту диэтанолламин был ацилирован в пиридине эквивалентным количеством активированного (пентафторфенилового) эфира 6-аминокапроновой кислоты, чья собственная аминокетильная группа была предварительно защищена флуоренилметоксикарбонильным (Fmoc) остатком. Продукт N-ацилирования (II) удобно не выделять, а обрабатывать DMT-Cl прямо в реакционном растворе. Получающаяся смесь соединений (II—IV) легко разделяется колоночной хроматографией на силикагеле, причем целевое моноаралкильное производное (III) используется на следующей стадии, а соединения (II) и (IV) могут быть снова превращены

Используемые сокращения: Fmoc — (9-флуоренил)метоксикарбонил; DMT — 4,4'-диметокси тригидрокси-1,2,3-пропантрикарбонил.



а) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHFmoc}$ /пиридин; б) DMT-Cl /пиридин;
 в) $i\text{Pr}_2\text{NH}/\text{MeCN}$; г) пентафторфениловый эфир
 (+)-биотина/пиридин; д) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (VIII)/
 тетразолид диизопропиламмония/ MeCN

в исходную смесь соответственно повторной обработкой DMT-Cl в пиридине и действием эквивалентного количества трифторуксусной кислоты в хлороформе.

После удаления из соединения (III) защитной Fmoc -группы полученный амин (V) был проацилирован пентафторфениловым эфиром биотина в пиридине с образованием спирта (VI). Его фосфитилирование бис (N, N -диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфином (VIII) привело к конечному амидиту — O^1 -(4,4'-диметокситритил)- O^5 -(N, N -диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-3-(N -биотинил-6-аминокапроил)-3-аза-1,5-пентандиолу (VII), который был выделен колоночной хроматографией на силикагеле и пересажден из толуола гексаном. ТСХ: R_f 0,26 (ацетон — триэтиламин, 9 : 1, пластинка Kieselgel 60 F_{254} , Merck). Масс-спектр (времяпролетный масс-спектрометр МСБХ с ионизацией осколками деления ^{252}Cf , ПО «Электрон», Сумы, Украина), $(m/z)^+$: 969,8 ($M + \text{Na}$), вычислено для $(\text{C}_{30}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{O}_8\text{PS} + \text{Na})$ 970,2. ^1H -ЯМР-спектр (спектрометр Bruker AC-500 (500 МГц); CDCl_3 ; δ , м. д.): 7,4—7,2, 6,9—6,8 (м, 13H, ArH); 6,24, 6,33 (2 уш. с., 2H, NHCONH); 5,49 (уш. с., 1H, CH_2NH); 4,46 (м, 1H), 4,28 (м, 1H, CHNHCONHCH); 3,85—3,5, 3,3—3,2 (м, 20H, $\text{CH}_2\text{OPOCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$, OCH_3 (3,79), CHCH_3 , CH_2NH); 3,13 (м, 1H, CHS); 2,87 (м, 1H), 2,71 (м, 1H, CH_2S); 2,61 (м, 2H, CH_2CN); 2,38 (м, 2H), 2,18 (м, 2H, $2\text{CH}_2\text{CO}$); 1,8—1,2 (м, 12H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,17 (м, 12H, CHCH_3).

Таким образом, фосфитилирующий реагент (VIII) получен из доступных

исходных веществ посредством довольно простой последовательности гладко протекающих реакций. Реагент, хорошо растворимый в ацетонитриле, не требует специальных условий конденсации и может быть использован в автоматическом синтезаторе подобно стандартным нуклеозидфосфамидитным синтонам. Этот реагент позволяет вводить один или несколько биотиновых остатков в олигонуклеотиды (в том числе по 5'-концу), причем количество метки, введенной на каждой стадии, можно контролировать по поглощению катиона DMТ⁺. Поскольку в основе реагента лежит нехиральная и даже непрохиральная псевдо-сахарная единица (на основе диэтанолamina [12]), исключается образование диастереомеров и, следовательно, потенциальная гетерогенность гибридизационных свойств модифицированных олигонуклеотидов; аминокaproильный спейсер обеспечивает дополнительную стерическую свободу авидин(стрептавидин)-биотиновых взаимодействий.

Авторы благодарны Т. А. Балашовой за регистрацию ¹H-ЯМР-спектра, Ю. П. Козьмину за регистрацию масс-спектра, М. С. Щепинову и Д. А. Стеценко за полезное обсуждение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avidin-Biotin Technology/Eds Bayer E. A., Wilchek M.//Meth. Enzymol. 1990. V. 184.
2. Goodchild J.//Bioconjugate Chem. 1990. V. 1. № 3. P. 165—187.
3. Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H., Ehrlich H. A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 16. P. 6230—6234.
4. Telser J., Cruickshank K. A., Morrison L. E., Netzel T. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 6966—6976.
5. Rigas B., Welcher A. A., Ward D. C., Weissman S. M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 24. P. 9591—9595.
6. Roget A., Bazin H., Teoule R.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 19. P. 7643—7651.
7. Pieleas U., Sproat B. S., Lamm G. M.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 15. P. 4355—4360.
8. Alves A. M., Holland D., Edge M. D.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 23. P. 3089—3092.
9. Cocuzza A. J.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 46. P. 6287—6290.
10. Pon R. T.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 14. P. 1715—1718.
11. Misiura K., Durrant I., Evans M. R., Gait M. J.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 15. P. 4345—4354.
12. Lin K.-Y., Matteucci M.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 11. P. 3111—3114.

Поступило в редакцию
24.IX.1992

V. A. KORSHUN, E. V. NOZHEVNIKOVA, Yu. A. BERLIN

A NOVEL REAGENT FOR PHOSPHORAMIDITE SYNTHESIS OF BIOTIN-LABELLED OLIGONUCLEOTIDES

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

A novel phosphitylating reagent, O¹-(4,4'-dimethoxytrityl)-O⁵-(N,N-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphinyl)-3-(N-biotinyl-6-aminocaproyl)-3-aza-1,5-pentanediol (VII), has been synthesized. The reagent can be used in the standard DNA synthesis to prepare oligonucleotides terminally labelled with biotin residue(s).