



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

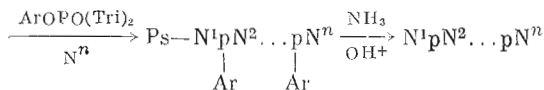
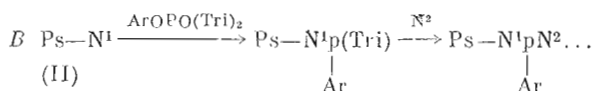
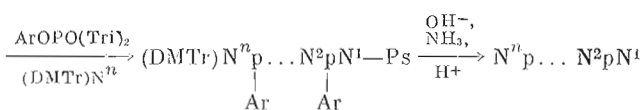
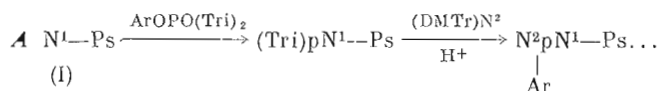
УДК 547.963.32.07

НОВЫЙ МЕТОД ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ ПУТЕМ

Добрынин В. Н., Чернов Б. К., Колосов М. Н.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Во всех традиционных методах твердофазного синтеза олигонуклеотидов к концевому нуклеозиду или нуклеотиду, закрепленному на полимерном носителе, последовательно присоединяют нуклеотиды, активированные заранее или непосредственно в реакционной среде, обычно с помощью арилсульфохлоридов. Нами разработан новый метод, в котором наращивание нуклеотидной цепи осуществляется без применения конденсирующих средств, путем взаимодействия нуклеозидного компонента, прикрепленного к полимеру, с бифункциональным фосфорилирующим реагентом типа $\text{ROPO}(=\text{O})\text{XY}$ и затем с мононуклеозидом или олигонуклеотидным блоком. Метод разработан в двух вариантах, *A* и *B* (см. схему), различающихся тем, как присоединено к полимеру-носителю первое нуклеозидное звено (через 3'-ОН или 5'-ОН) и в каком направлении растет синтезируемая олигонуклеотидная цепь (3'-ОН \leftarrow 5'-P или 3'-P \rightarrow 5'-ОН).



N – N-защищенный нуклеозид или N,P-защищенный динуклеозидфосфат, Ps – полимерный носитель, Ar – *n*-хлорфенил, Tri – *сис,м*-триазол-4-ил, DMTr – *n*, *n'*-диметокситриил.

В качестве носителей мы использовали продажные макропористые сополимеры стирола с дивинилбензолом: бензгидриламиновую смолу, выпускаемую Protein Research Foundation (сшивка 2%, содержание NH_2

0,4 ммоль/г, 200–400 меш), и полистирол био-биде фирмы Bio-Rad (сшив-ка 1%, 200–400 меш), в который вводили диметокситритилхлоридные группы по методу [1]. Для приготовления 3'-нуклеозил-полимера (I) аминосмолу сначала ацилировали триазолидом 5'-диметокситритил-3'-нуклеозилсукцината (синтезировали из соответствующего кислого эфира и триазола в присутствии дигидроксикарбондимида), а затем ацетилировали уксусным ангидридом, после чего DMTr-группу удаляли 1% бензолсульфокислотой в хлороформе. Для получения 5'-нуклеозил-полимера (II) тритилхлоридную смолу обрабатывали в пиридине нуклеозидом и затем метанолом. В обоих полимерах нуклеозидная нагрузка составляла 0,20 ммоль/г.

Все реакции твердофазного синтеза вели без перемешивания, в центрифужной пробирке или в шприце с фильтром, как описано Плессом и Летсингером [2]. Фосфорилирование на полимере проводили в безводном пиридине при помощи 0,7–0,9 М *n*-хлорфенилфосфобистриазолида (20° С, 30 мин), а межнуклеотидные конденсации — с 0,5–0,7 М нуклеозидом или динуклеозидхлорфенилфосфатом в том же растворителе в присутствии 0,2–0,3 М 4-диметиламинопиридина, который является сильным катализатором этих реакций [3]. Конечные олигонуклеотиды выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М моче-вине при pH 7,5 и затем 3,5.

Вариант А был нами исследован на примере получения гептадезоксинуклеотида С-Т-Т-Т-Т-Т-Т. В этом синтезе длительность конденсаций варьировала от 5 до 20 ч. 5'-Гидроксил деблокировали 1% бензолсульфокислотой в хлороформе и по количеству образовавшегося диметокситри-танола, определяемому спектрофотометрически, судили о полноте превра-щения на данной стадии (каждая стадия включает фосфорилирование, конденсацию и деблокирование). Выход на отдельных стадиях колебался от 75 до 98%, в среднем превышая 85%. После завершения синтеза за-щищенный олигонуклеотид отщепляли от полимера 0,1 н. щелочью в 98% пиридине (1 ч при 20° С) и подвергали аммонолизу (30% NH₃, 10 ч при 60° С) и гидролизу (80% AcOH, 20 мин при 20° С). Хроматографически гомогенный гептадезоксинуклеотид СТ₆ был получен с выходом 3,5%, что соответствует среднему выходу 57% на каждой из 6 стадий, если не учи-тывать потерь при отщеплении от полимера и деблокировании.

Вариант В отличается от А прежде всего тем, что межнуклеотидные связи здесь образуются в результате фосфорилирования 5'-оксисоедине-ния 3'-фосфатом (3'-P→5'-OH). Реакционная способность первичной спиртовой группы 5'-OH значительно выше, чем у вторичного гидроксила 3'-OH, благодаря чему, во-первых, 3'-OH можно не защищать и, во-вторых, конденсация протекает быстрее, чем по пути А. Так, исходя из 5'-тими-дил-полимера (II) и проводя попеременно фосфорилирование бистриазо-лидом и конденсацию с 3',5'-незащищенным нуклеозидом (1,5–2 ч при 20° С), мы синтезировали олигодезоксинуклеотид Т-Т-Т-Т-Т-Т-бзС. После аммонолиза (7 ч при 60° С) и отщепления от полимера (80% AcOH, 20 мин при 20° С) был выделен гептадезоксинуклеотид Т₆С с выходом 8% (т. е. в среднем 66% на каждой стадии). Нуклеотидная последовательность по-лученного вещества и отсутствие в нем неприродных 3',3'- и 5',5'-фосфо-диэфирных связей были доказаны частичным и полным гидролизом фос-фодиэстеразой змеиного яда.

Для получения высших олигонуклеотидов синтез в обоих вариантах, А и В, целесообразно вести блочным способом, используя Р-защищенные динуклеозидфосфаты и их 5'-диметокситритильные производные, удобный метод получения которых описан нами ранее [3]. Так, путем А мы син-тезировали 11-членный дезоксинуклеотид С-С-Т-Т-Т-Т-Т-Т-Т-Т-Т в ре-зультате присоединения к 3'-тимирил-полимеру (I) четырех «двоек» Tr(PhCl)T и одной bzCp(PhCl)bzC. Конечный ундекадезоксинуклеотид С₂Т₉ был выделен с выходом 1% (средний выход на одной стадии около

