



УДК 547.962.32.07 p/c +

ТРИФТОРУКСУСНАЯ КИСЛОТА И ХЛОРИСТЫЙ АЛЮМИНИЙ
КАК РЕАГЕНТЫ ДЕТРИТИЛИРОВАНИЯ В ФОСФОТРИЭФИРНОМ
СИНТЕЗЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ*Буткус В. В., Климануэкас С. И., Берлин Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

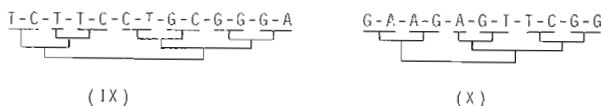
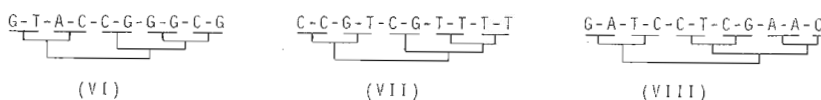
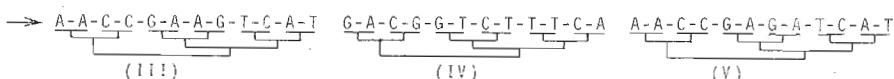
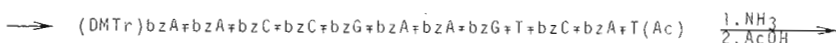
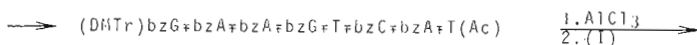
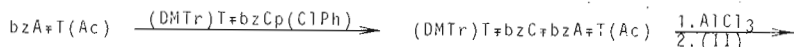
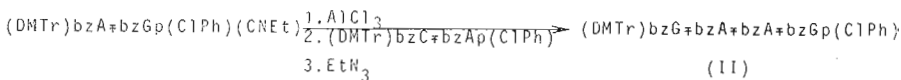
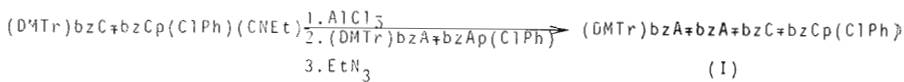
Показана эффективность трифторуксусной кислоты и хлористого алюминия в сопоставлении с бензолсульфокислотой в качестве реагентов для удаления диметокситритильной группы в фосфотриэфирном синтезе олигонуклеотидов. С помощью этих реагентов синтезировано 8 олигодезоксирибонуклеотидов длиной 10–13 звеньев; они очищены высокоэффективной жидкостной хроматографией, и их структура доказана методом нуклеотидных карт.

В синтезе олигодезоксирибонуклеотидов фосфотриэфирным методом обычный ход наращивания цепи включает чередование кислотного и основного воздействий с отщеплением диметокситритильного и β -цианэтильного остатков, в результате чего происходит деблокирование соответственно 5'-гидроксильной и 3'-фосфатной групп двух компонентов предстоящей межнуклеотидной конденсации. Вторая из этих реакций протекает при мягком воздействии триэтиламина, так что удаление цианэтильной группы с образованием фосфатного компонента вполне селективно. В то же время бензолсульфокислота, обычно используемая для отщепления диметокситритильной группы, не столь безобидна и способна расщеплять также N-гликозидные связи в защищенных по гетероциклическому ядру пуриновых (особенно адениновых) нуклеотидах [1]. Эта побочная реакция не только уменьшает выход целевого соединения (особенно в случае многократных кислотных обработок при синтезе длинных нуклеотидов), но и существенно усложняет состав смеси после полного деблокирования конечного олигонуклеотида, так как продукты депуринизации в ходе аммонолиза могут расщепляться по соответствующим углеводно-фосфатным связям.

Поиски более мягких способов детритилирования, применение которых снизило бы долю побочных реакций, привели к использованию трихлоруксусной кислоты [2], а также кислот Льюиса (прежде всего бромистого цинка) в качестве новой разновидности детритилирующих реагентов [3, 4]. В настоящей работе были исследованы трифторуксусная кислота и хлористый алюминий в сопоставлении с бензолсульфокислотой и показано, что эти реагенты могут быть успешно использованы в фосфотриэфирном синтезе олигонуклеотидов длиной до 13 звеньев (трифторуксусная кислота ранее была использована в синтезе коротких пиримидиновых нуклеотидов [5]; упоминание об использовании хлористого алюминия для детритилирования защищенных нуклеозидов см. [6]).

Синтез олигонуклеотидов проводили фосфотриэфирным методом [7], исходя из N-бензоилнуклеозид-3'-*n*-хлорфенилфосфатов, в которых 5'-гидроксил защищен DMTr-группой (фосфатный компонент) или же фосфат блокирован β -цианэтильным остатком (гидроксильный компонент). Нуклеотидную цепь наращивали начиная с 3'-концевого нуклеозида, в котором

В работе использованы следующие нестандартные сокращения: DMTr — 4,4'-диметокситритил, ClPh — *n*-хлорфенил, символом \mp обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком. Префикс d (деокси) для краткости всюду опущен.



3'-гидроксил защищен ацетильной группой. В качестве конденсирующего реагента для образования межнуклеотидной связи использовали 2,4,6-триизопропилбензолсульфотетразолид (TPST). В ходе работы было синтезировано 8 олигонуклеотидов длиной 10–13 звеньев (схема) с использованием в качестве реагента детритилирования хлористого алюминия (соединения (III)–(V)), трифторуксусной кислоты (соединения (VI) и (VII)) и бензолсульфокислоты (соединения (VIII)–(X)). Продукты межнуклеотидной конденсации выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе. После удаления защитных групп аммонолизом и кислотным гидролизом деблокированные олигонуклеотиды очищали анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в нейтральном 7 M растворе мочевины или же ТЕАВ в водном спирте, после чего дополнительно очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (кривые для ряда веществ приведены на рис. 4). Сведения о выходах синтезированных олигонуклеотидов (после деблокирования и хроматографической очистки) представлены в таблице; их первичная структура доказана методом нуклеотидных карт [8] (рис. 2).

Как видно из полученных результатов, использование для детритилирования хлористого алюминия и трифторуксусной кислоты вместо бензолсульфокислоты не снижает выходов продуктов конденсаций и при этом позволяет получать олигонуклеотиды высокой степени чистоты. Особенно показательны в этом отношении олигонуклеотиды (III), (V) и (VI) (см. рис. 4, 2): в них больше половины мономерных звеньев приходится на долю пуринов, причем в обоих додекануклеотидах (III) и (V) содержится по пять остатков аденина, однако эти синтезы прошли не менее гладко, чем в случае более простых, богатых пиримидинами соединений, что свидетельствует о незначительной депуринизации (см. таблицу). Вместе с тем

Синтез олигонуклеотидов

Синтезированные олигонуклеотиды	Детритилирующий реагент	Суммарный выход олигонуклеотида	
		ОЕ ₂₈₀	%
(III)	AlCl ₃	22	1,9
(IV)	AlCl ₃	35	2,3
(V)	AlCl ₃	19	2,7
(VI)	CF ₃ COOH	30	2,0
(VII)	CF ₃ COOH	24	2,1
(VIII)	PhSO ₃ H	55	1,8
(IX)	PhSO ₃ H	32	1,6
(X)	PhSO ₃ H	28	2,5

большая мягкость этих реагентов позволяет проводить детритилирование без охлаждения, при комнатной температуре. Правда, применение хлористого алюминия не исключает стадии разложения реакционной смеси (использовалась обработка тартратом аммония, основанная на способности ряда оксикислот образовывать с ионами алюминия растворимые комплексы) с последующей экстракцией перед хроматографией. Напротив, трифторуксусная кислота позволяет избежать этого этапа: оказалось, что разбавление реакционной смеси этанолом прекращает кислотное воздействие, после чего достаточно нескольких упариваний со спиртом, чтобы полностью удалить кислоту и без какой-либо дополнительной обработки проводить адсорбционную хроматографию. Нетрудно видеть, что при синтезе в растворе этот вариант в препаративном отношении наиболее привлекателен. С другой стороны, в случае твердофазного синтеза применение описанных выше детритилирующих реагентов позволяет исключить из реакционной смеси спирт, который делает более умеренной активность кислот, но вызывает изменение набухания полимера, а его полное удаление перед проведенном очередной конденсации требует дополнительных промывок.

Экспериментальная часть

В работе использованы нуклеозиды фирм Sigma и Calbiochem, [γ -³²P]rATP (Amersham) с уд. акт. 2000 Ки/ммоль, DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman), DEAE-целлюлоза MN-300 и целлюлоза MN-300 HR (Serva), сефадекс G-50, сверхтонкий (Pharmacia), дауэкс 50×8 (Serva), полоски ацетилцеллюлозы 3×55 см (Schleicher und Schüll), силикагель L40-100 (Chemapol), пластинки Silufol UV254 (Kavalier), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Worthington), T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) [9].

Синтез олигонуклеотидов. TPST и (DMTr)bzG получали по методу [7]. 3'-фосфорилирование защищенных нуклеозидов (кроме (DMTr)bzG) проводили в пиридине [10], (DMTr)bzG фосфорилировали по методу [7]. DMTr-группу удаляли (см. таблицу): а) действием 2% PhSO₃H в смеси хлороформ — метанол, 7 : 3, в течение 3 мин при 0° С с последующей обработкой 0,5 М NaHCO₃ [7]; б) действием 2% раствора свежезоленного AlCl₃ в абс. нитрометане (2 мин, 20° С) с последующим разложением 1 М раствором тартрата аммония и экстракцией хлороформом; в) действием 3% раствора CF₃COOH в ацетонитриле (5 мин, 20° С) с последующим прибавлением равного объема этанола, упариванием, двукратным упариванием со смесью ацетонитрил — этанол, 1 : 1, и наконец, двукратным упариванием с толуолом для удаления спирта (ср. [5]). Цпанэтильную группу удаляли действием смеси пиридин — триэтиламин — вода, 3 : 1 : 1, в течение 25 мин при 20° С [11], межнуклеотидные конденсации проводили в основном как описано в работах [12, 13]. Конечные олигонуклеотиды полностью деблокировали действием 25% водн. NH₃ (12 ч при 50° С) и затем 80% уксусной кислоты (30 мин при 20° С). Результаты синтеза, деблокирования и очистки синтезируемых олигонуклеотидов приведены в таблице.

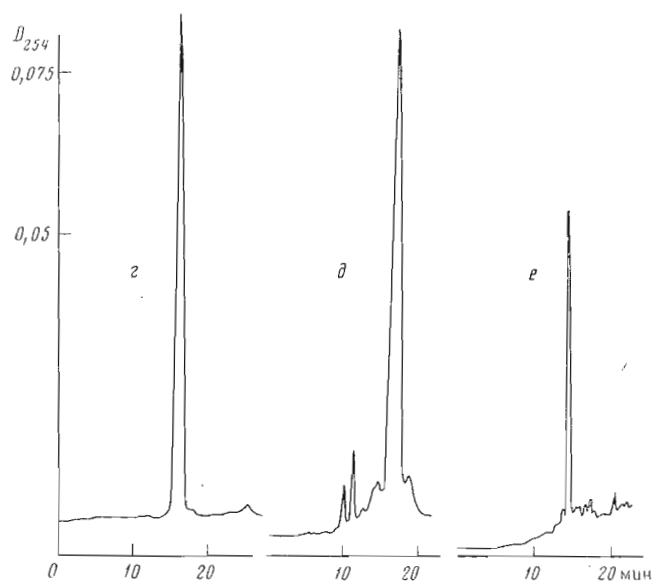
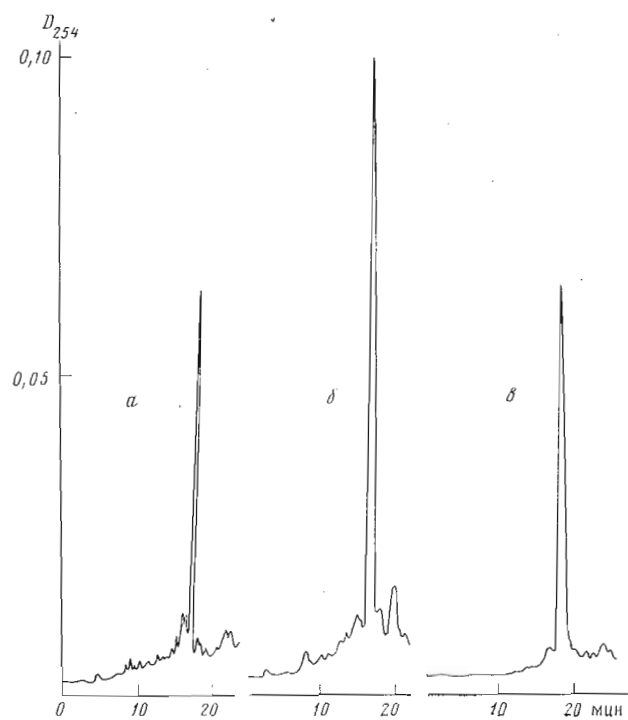


Рис. 1. Выделение олигонуклеотидов (III)–(V), (VII), (IX) и (X) высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией на колонке Zorbax-CS (хроматограф Du Pont 8800): *a* – (III), *б* – (IV), *в* – (V), *г* – (VII), *д* – (IX), *е* – (X)

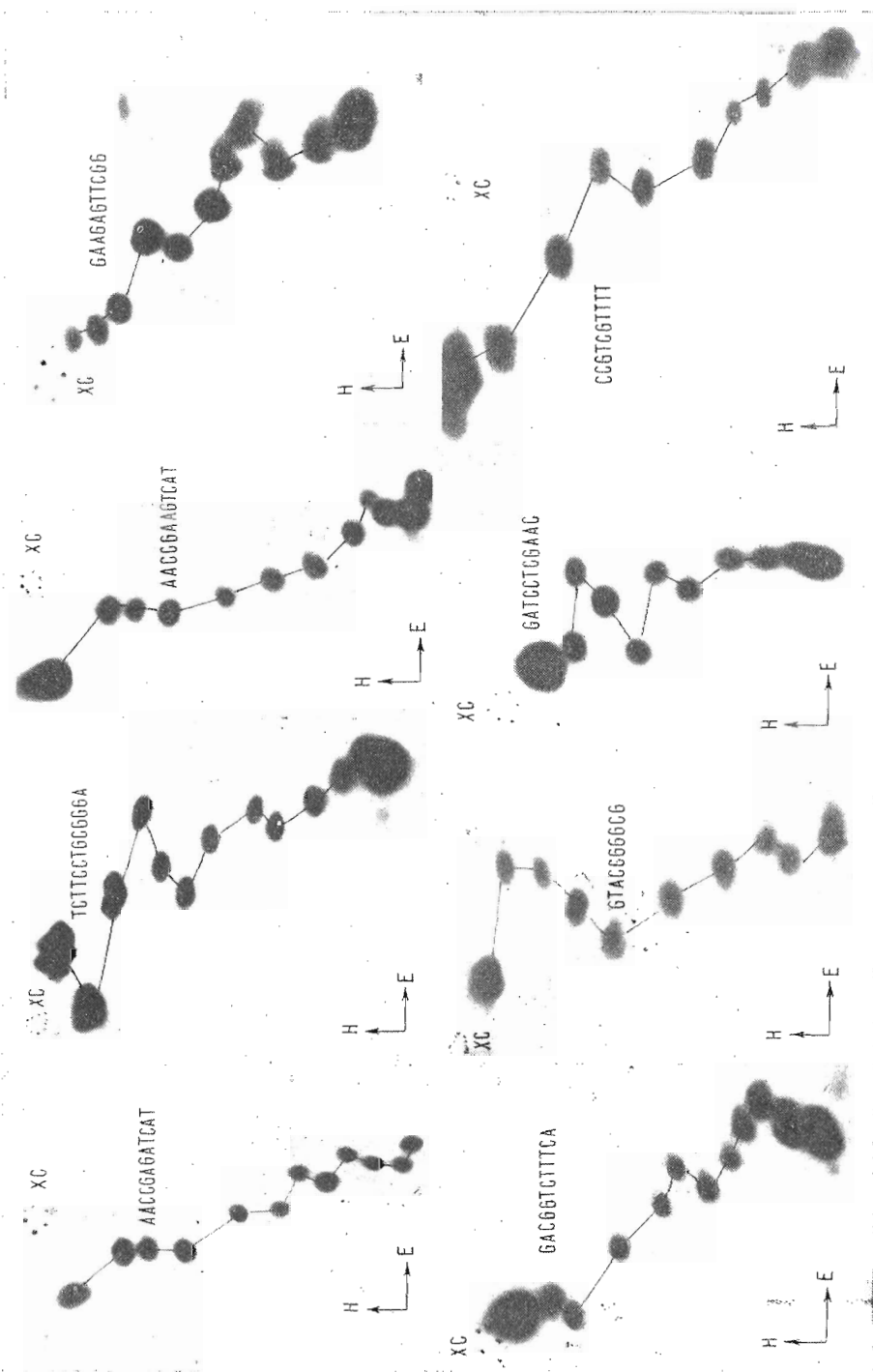


Рис. 2. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-³²P-фосфорилированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда; направление E – электрофорез на плоские ацетиленолозы в пиридин-ацетатном буфере (pH 3.5) при 50 В/см, направлении H – гомохроматография в томоэкси VI [8]; XC – пятно хлороксила ксиленизола FF

Авторы благодарны А. Н. Вульфсону и С. А. Якимову за проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reese C. B. *Tetrahedron*, 1978, v. 34, № 21, p. 3143-3179.
2. Gait M. J., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. *Nucl. Acids Res.*, 1980, Symposium Series № 7, p. 243-257.
3. Matteucci M. D., Caruthers M. H. *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, № 34, p. 3243-3246.
4. Kohli V., Blöcker H., Köster H. *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, № 28, p. 2683-2686.
5. Catlin C. J., Cramer F. *J. Org. Chem.*, 1973, v. 38, № 2, p. 245-250.
6. Matteucci M. D., Caruthers M. H. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1981, v. 103, № 11, p. 3185-3191.
7. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
8. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1974, v. 1, № 3, p. 331-353.
9. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О., Лебедевко Е. Н., Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. И. *Биооргани. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1026-1036.
10. Добрынин В. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов В. К., Колосов М. И. *Биооргани. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 523-534.
11. Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Iakura K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 12, p. 5765-5769.
12. Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Каюшин А. Л. *Биооргани. химия*, 1980, т. 6, № 8, с. 1182-1195.
13. Берлин Ю. А., Буркус В. В. *Биооргани. химия*, 1981, т. 7, № 8, с. 1224-1232.

Поступила в редакцию
2.VI.1982

TRIFLUOROACETIC ACID AND ALUMINIUM CHLORIDE AS DETRITYLATION REAGENTS IN THE PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

BURKUS V. V., KLIMAŠAUSKAS S. J., BERLIN Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Trifluoroacetic acid and aluminium chloride have been compared with benzenesulfonic acid as detritylation reagents and proved to be efficient in the modified phosphotriester synthesis of oligodeoxyribonucleotides. Eight nucleotides varying in chain length from deca- to tridecamer have been synthesised, purified by HPLC and structurally analysed by fingerprinting technique.