БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 8 • № 2 • 1982

УДК 547.963.32.07

# СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ GGCCTGTTTGGC и $T(pT)_{14}$ ТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 5′-*n*-ХЛОРФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ БЛОКОВ

*Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В.*

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР*

Осуществлен синтез додекадезоксирибонуклеотида GGCCTGTTTGGC и пентадекатимидилата блочным триэфирным методом исходя из 5′-*n*-хлорфениловых эфиров используемых олигонуклеотидных блоков. Додекануклеотид получен конденсацией динуклеотидных блоков по схеме [(2+2)+2]+[(2+2)+2], пентадекатимидилат – конденсацией тринуклеотидных блоков по схеме [3+(3+3)]+(3+3). Ди- и тринуклеотидные блоки были получены исходя из *n*-хлорфениловых эфиров N-ацил-3′-О-левулинилнуклеозид-5′-фосфатов (Р-компонент) и β-цианэтил-*n*-хлорфениловых эфиров N-ацилнуклеозид-5′-фосфатов (ОН-компонент). Конденсацию осуществляли с помощью толуолсульфотетразолида, используя эквимольные соотношения ОН- и Р-компонентов.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов триэфирным методом, как правило, осуществляется исходя из 3′-*n*-хлорфениловых эфиров нуклеотидов [1]. Для защиты 5′-гидроксильной группы нуклеотидного компонента традиционно используется моно- или диметокситритильная защитные группы, удаление которых, как правило, сопровождается частичной апуринизацией [1].

Ранее мы показали, что для синтеза олигонуклеотидов могут быть использованы 5′-*n*-хлорфениловые эфиры нуклеотидов [2], с помощью которых синтезирован олигонуклетид, богатый аденинoвыми остатками [3]. В предложенном варианте синтеза исключается применение кислотолабильной защитной группы. Блокирование 3′-оксигруппы Р-компонента осуществляется ранее предложенной и успешно использованной в синтезе олигорибонуклеотидов левулинильной группой [4]. Удаление ее гидразингидратом не приводит к деблокированию N-ацильных и хлорфенильных защитных групп [4].

В настоящем сообщении представлены результаты синтеза гетерогенного додекадезоксинуклеотида GGCCTGTTTGGC и олиготимидилата $T(pT)_{14}$ исходя из 5′-*n*-хлорфениловых эфиров олигонуклеотидных блоков. Синтез осуществлен триэфирным методом в присутствии толуолсульфотетразолида. Наращивание нуклеотидной цепи проведено блочным методом. В качестве исходных мономеров использованы 5′-*n*-хлорфенил-β-цианэтил-N-ацилнуклеозид-5′-фосфаты (ОН-компонент) и 5′-*n*-хлорфенил-N-ацил-3′-О-левулинилнуклеозид-5′-фосфаты (Р-компонент). Гетероциклические аминогруппы оснований блокированы обычным способом: изобутирильная защитная группа использована для гуанина и анизоильная для цитидина.

Для блокирования 5′-концевого фосфата додекануклеотида использована дианилидная защитная группа [5], для 3′-концевого гидроксила – бензоильная группа. Синтез динуклеотидных блоков осуществлен по аналогии с работой [2]. Последовательность соединения динуклеотидов в более крупные блоки приведена на схеме 1. При конденсации динуклеотидных блоков (I)+(II) и (VI)+(IV) получены соответственно тетрануклео-

Сокращения: TST – толуолсульфотетразолид, ClPh – *n*-хлорфенильный остаток, Lev – левулинильный остаток, ∓ – межнуклеотидная фосфатная группа, блокированная *n*-хлорфенильным остатком, ib – изобутирил. Префикс d везде опущен, поскольку в статье упоминаются только дезоксинуклеотиды.

*Схема 1*

$$(PhNH)_2pibG{\mp}ibG + (ClPh)panC{\mp}anC(Lev) \rightarrow (PhNH)_2pibG{\mp}ibG{\mp}anC{\mp}anC(Lev) \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O} (PhNH)_2pibG{\mp}ibG{\mp}anC{\mp}anC + (ClPh)pT{\mp}ibG(Lev) \rightarrow$$
(I) (II) (III) (IIIa) (IV)

$$\rightarrow (PhNH)_2pibG{\mp}ibG{\mp}anC{\mp}anC{\mp}T{\mp}ibG(Lev) \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O} (PhNH)_2pibG{\mp}ibG{\mp}anC{\mp}anC{\mp}T{\mp}ibG$$
(V) (Va)

$$(ClPh, CNEt)pT{\mp}T + (IV) \rightarrow (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}ibG(Lev) \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O} (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}ibG + (ClPh)pibG{\mp}anC(Bz) \rightarrow (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}ibG{\mp}$$
(VI) (VII) (VIIa) (VIII) (IX)

$$\mp ibG{\mp}anC(Bz) \xrightarrow{N(C_2H_5)_3} (ClPh)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}ibG{\mp}ibG{\mp}anC(Bz) + (Va) \rightarrow (PhNH)_2pibG{\mp}ibG{\mp}anC{\mp}anC{\mp}T{\mp}ibG{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}ibG{\mp}ibG{\mp}anC(Bz) \rightarrow GGCCTGTTTGGC$$
(IXa) (X) (XI)

*Схема 2*

$$(Tr)T + (ClPh)pT{\mp}T(Lev) \rightarrow (Tr)T{\mp}T{\mp}T(Lev) \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O} (Tr)T{\mp}T{\mp}T$$
(XII) (XIII) (XIIIa)

$$(ClPh, CNEt)pT + (XII) \longrightarrow (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T(Lev) \begin{cases} \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O} (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T \\ \xrightarrow{N(C_2H_5)_3} (ClPh)pT{\mp}T{\mp}T(Lev) \end{cases}$$
(XIV) (XIVa) (XIVb)

$$(XIVa) + (XIVb) \rightarrow (ClPh, CNEt)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}T(Lev) \xrightarrow{N(C_2H_5)_3} (ClPh)pT{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}T{\mp}T(Lev) + (XIIIa) \rightarrow (Tr)T(\mp T)_7\mp T(Lev) \xrightarrow{N_2H_4\cdot H_2O}$$
(XV) (XVa) (XVI)

$$\rightarrow (Tr)T(\mp T)_8 + (XVa) \rightarrow (Tr)T(\mp T)_{13}\mp T(Lev) \rightarrow T(pT)_{14}$$
(XVIa) (XVII) (XVIII)

*Таблица 1*

**Синтез додекануклеотида GGCCTGTTTGGC**

| Олигонуклеотид | Исходные вещества (ммоль) | | TST, ммоль | Ру, мл | Время, ч | Выход *, % | $R^*_{(Tr)T}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Р-компонент | ОН-компонент | | | | | |
| $(PhNH)_2$pibG∓ibG∓anC∓anC(Lev) (III) | (ClPh)panC∓anC(Lev) (0,75) | $(PhNH)_2$pibG∓ibG (0,70) | 2,24 | 3,3 | 1 | 56(84) | 0,96(0,78) |
| (ClPh, CNEt)pT∓T∓T∓ibG(Lev) (VII) | (ClPh)pT∓ibG(Lev) (0,87) | (ClPh, CNEt)pT∓T (0,80) | 2,56 | 4,0 | 1,25 | 63(89) | 0,90(0,65) |
| $(PhNH)_2$pibG∓ibG∓anC∓anC∓T∓ibG(Lev) (V) | (ClPh)pT∓ibG(Lev) (0,43) | $(PhNH)_2$pibG∓ibG∓anC∓∓anC (0,32) | 1,22 | 2,0 | 1,5 | 80(86) | 0,99(0,90) |
| (ClPh, CNEt)pT∓T∓T∓ibG∓ibG∓anC(Bz) (IX) | (ClPh)pibG∓anC(Bz) (0,36) | (ClPh, CNEt)pT∓T∓T∓∓ibG (0,37) | 1,1 | 2,0 | 1,5 | 63 | 1,00 |
| $(PhNH)_2$pibG∓ibG∓anC∓anC∓T∓ibG∓T∓T∓∓T∓ibG∓ibG∓anC∓(Bz) (X) | (ClPh)pT∓T∓T∓ibG∓ibG∓∓ibG∓anC(Bz) (0,054) | $(PhNH)_2$pibG∓ibG∓anC∓∓anC∓T∓ibG (0,049) | 0,16 | 0,25 | 1,5 | 58 | 1,05 |

* В скобках приведены выход и значения $R_{(Tr)T}$ соответствующих олигонуклеотидов после удаления левулинильной защитной группы [4] и выделения хроматографией на силикагеле.

*Таблица 2*

**Синтез пентадекатимидилата $T(pT)_{14}$**

| Олигонуклеотид | Исходные вещества (ммоль) | | TST, ммоль | Ру, мл | Время, ч | Выход *, % | $R^*_{(Tr)T}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ОН-компонент | Р-компонент | | | | | |
| (Tr)T∓T∓T(Lev) (XIII) | (Tr)T (1,2) | (ClPh)pT∓T(Lev) (1,2) | 3,0 | 10 | 1,5 | 54(76) | 1,10(0,92) |
| (ClPh, CNEt)pT∓T∓T(Lev) (XIV) | (ClPh, CNEt)pT (3,1) | (ClPh)pT∓T(Lev) (3,1) | 9,0 | 20 | 1 | 76(88) | 1,03(0,82) |
| (ClPh, CNEt)pT∓T∓T∓T∓T∓T(Lev) (XV) | (ClPh, CNEt)pT∓T∓T (1,0) | (ClPh)pT∓T∓T(Lev) (1,0) | 3,0 | 8 | 2,5 | 70 | 1,03 |
| (Tr)T(∓T)$_8$(Lev) (XVI) | (Tr)T∓T∓T (0,4) | (ClPh)pT(∓T)$_5$(Lev) (0,4) | 1,2 | 2 | 2 | 56(80) | 1,12(0,97) |
| (Tr)T(∓T)$_{14}$(Lev) (XVII) | (Tr)T(∓T)$_8$ | (ClPh)pT(∓T)$_5$(Lev) | 0,12 | 0,3 | 2 | 83 | 1,13 |

* В скобках даны значения $R_{(Tr)T}$ и приведен выход олигонуклеотидов после удаления левулинильной защитной группы [4] и выделения хроматографией на силикагеле.

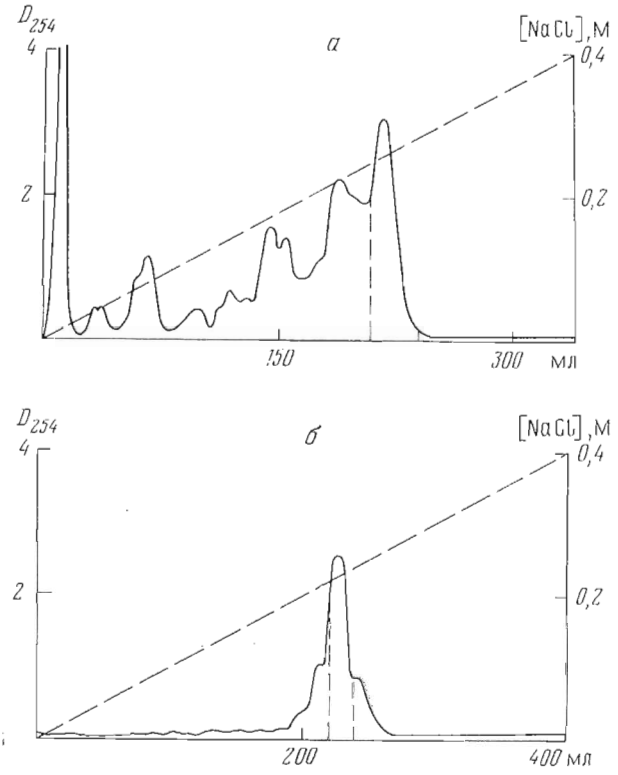


Рис. 1

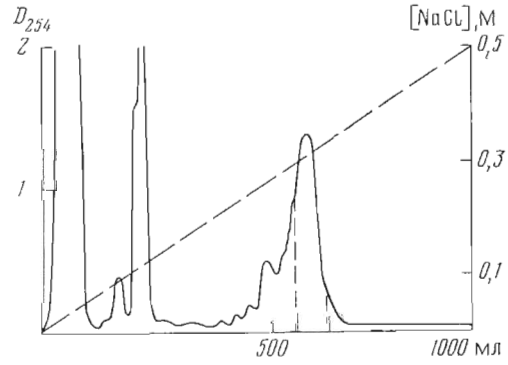


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография додекануклеотида (XI) после удаления всех защитных групп на колонке с DEAE-целлюлозой ($Cl^-$) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине: *а* – колонка 1,3×13 см, 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), скорость элюции 0,4 мл/мин; *б* – рехроматография додекануклеотида (XI), колонка 1×7 см, pH 3,5 (HCl), 0,4 мл/мин

Рис. 2. Хроматография $T(pT)_{13}$ после удаления всех защитных групп на колонке с DEAE-целлюлозой ($Cl^-$, 1,5×15 см) в градиенте концентрации NaCl (0→0,5 М) в 7 М мочевине, 0,1 М трис-HCl, pH 7,5 (1 л, 2 мл/мин)

тиды (III) и (VII). После деблокирования 3′-оксигрупп тетрануклеотид (IIIa) введен в реакцию конденсации с динуклеотидом (IV), а тетрануклеотид (VIIa) с динуклеотидом (VIII) и получены два гексануклеотида (V) и (IX) соответственно. После удаления β-цианэтильной и левулинильной защитных групп они использованы для синтеза додекануклеотида (XI).

Синтез олиготимидилата (XVIII) осуществлен с использованием три-

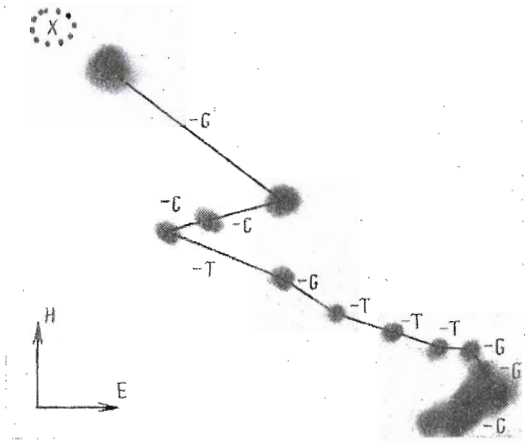


Рис. 3. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза 5′-$^{32}$P-фосфорилированного додекануклеотида (XI) фосфодиэстеразой змеиного яда. Направление Е – электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) при 90 В/см, направление Н – гомохроматография в гомосмеси, X – пятно красителя ксиленцианола [7]

нуклеотидных блоков (схема 2). Тринуклеозиддифосфат (XIII) и тринуклеотид (XIV) получены конденсацией динуклеотида (XII) с (Tr)T и β-цианэтил-*n*-хлорфениловым эфиром тимидин-5′-фосфата соответственно. После деблокирования 3′-гидроксильной и удаления β-цианэтильной групп в тринуклеотиде (XIV) конденсацией образовавшихся блоков (XIVa) и (XIVб) синтезирован гексануклеотид (XV). Удалением цианэтильной группы он был превращен в хлорфениловый эфир (XVa) и использован в качестве Р-компонента в реакции конденсации с тринуклеозиддифосфатом (XIIIa). В образовавшемся нонатимидилате (XVI) удаляли левулинильную защитную группу и из полученного олигомера (XVIa) и гексатимидилата (XVa) синтезировали защищенный олиготимидилат (XVII). Полное деблокирование последнего приводило к пентадекатимидилату (XVIII).

В качестве конденсирующего реагента на всех стадиях синтеза использован TST в 3-кратном избытке по отношению к Р-компоненту. Соотношение Р- и ОН-компонентов на всех стадиях синтеза близко к эквимольному (табл. 1, 2). Продукты межнуклеотидных конденсаций выделены адсорбционной хроматографией на силикагеле. Полностью блокированные олигонуклеотидные блоки имеют хроматографическую подвижность, близкую к подвижности (Tr)T, причем с увеличением длины блоков их $R_f$ несколько возрастает. Олигонуклеотиды с деблокированной 3′-гидроксильной группой значительно менее подвижны, что способствует достаточно хорошему отделению непрореагировавшего ОН-компонента от целевого олигонуклеотида хроматографией на силикагеле. Полностью деблокированные олигонуклеотиды (XI) и $T(pT)_{11}$ выделены ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 (рис. 1*а* и 2). Додекануклеотид (XI) дополнительно очищен хроматографией при pH 3,5 в градиенте концентрации NaCl в 7М растворе мочевины (рис. 1*б*).

Для доказательства нуклеотидной последовательности додекануклеотид (XI) был дефосфорилирован щелочной фосфатазой *E. coli*, затем 5′-фосфорилирован действием [γ-$^{32}$P]ATP и T4-полинуклеотидкиназы. Образовавшийся 5′-$^{32}$P-меченный олигонуклеотид подвергнут частичному гидролизу при помощи фосфодиэстеразы змеиного яда. Гидролизат разделяли в двух направлениях посредством электрофореза и гомохроматографии (рис. 3) [7].

По данным микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине при pH 7,5 выделенный $T(pT)_{11}$ хроматографически гомоге-

нен, однако по данным радиоавтографии гель-электрофореза пентадекатимидилата после фосфорилирования его [$\gamma$-$^{32}$P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназой наряду с основным пятном, соответствующим 15-членному олигонуклеотиду, регистрируются заметные количества додека-, тридека- и тетрадекатимидилатов, образующихся при деблокировании триэфирного олигонуклеотида и не отделившихся при хроматографии на DEAE-целлюлозе.

Таким образом, полученные результаты настоящей работы в совокупности с данными работ [2, 3] свидетельствуют о том, что, используя предложенную комбинацию защит по Р-, N- и ОН-группам, олигонуклеотиды любой последовательности могут быть успешно получены триэфирным методом исходя из 5′-*п*-хлорфениловых эфиров как мононуклеотидов, так и олигонуклеотидных блоков.

## Экспериментальная часть

В работе использованы *п*-хлорфениловые эфиры N-защищенных нуклеозид-5′-фосфатов и 5′-тритилтимидин (ОХП НИОХ СО АН СССР), N$^2$-изобутирилдезоксигуанозин-5′-фосфодианилид [5], толуолсульфотетразолид [1], DEAE-целлюлоза D-32 (Whatman, Англия), силикагель Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), пластинки Kieselgel 60 $F_{254}$ (Merck, ФРГ), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1; СКТБ БАВ Главмикробиопрома, Новосибирск), Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78).

β-Цианэтил-*п*-хлорфениловые эфиры N-ацилнуклеозид-5′-фосфатов и динуклеотидные блоки получены по аналогии с методикой [2].

*Межнуклеотидные конденсации* (табл. 1, 2). Смесь Р- и ОН-компонентов, высушенную упариванием с пиридином, растворяли в пиридине и добавляли толуолсульфотетразолид. За ходом реакции следили по данным ТСХ в системе хлороформ — метанол (8,5 : 1,5). После окончания реакции к раствору добавляли удвоенный объем воды и оставляли на 20—30 мин. Затем раствор триэфиры экстрагировали равным объемом хлороформа. Объединенный хлороформный экстракт упаривали и остатки пиридина удаляли упариванием с толуолом. Продукт конденсации выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (150 мл), элюируя градиентом концентрации этанола в хлороформе (до 5—10% этанола).

Удаление Р-защитной цианэтильной группы осуществляли действием триэтиламина в пиридине по методике [6]. Раствор упаривали и деблокированное соединение использовали в синтезе без выделения.

Удаление 3′-О-левулинильной защитной группы проводили как в работе [4]. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле (см. табл. 1 и 2) и использовали в качестве ОН-компонента для межнуклеотидной конденсации.

*Выделение GGCCTGTTTGGC (XI).* Раствор 300 $OE_{260}$ додекануклеотида (X) в 0,525 мл смеси пиридин — уксусная кислота — изоамилнитрит (1 : 1 : 0,1) выдерживали 4 ч при 37° С [5]. После упаривания к остатку добавляли 15 мл 25% водного аммиака и выдерживали 48 ч при 20° С и 5 ч при 50° С. Продукт выделяли хроматографией на колонке с DE-32-целлюлозой ($Cl^-$, 1,3×13 см) в градиенте концентрации NaCl, pH 7,5 (0→→0,4 М, 340 мл, скорость элюции 0,4 мл/мин) (рис. 1*а*); выход додекануклеотида 58,8 $OE_{260}$. После рехроматографии на колонке с DE-32-целлюлозой ($Cl^-$, 1×7 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, pH 3,5 (0→0,4 М, 400 мл, скорость элюции 0,4 мл/мин) (рис. 1*б*) получено 24,1 $OE_{260}$ (205 нмоль) додекануклеотида (XI), нуклеотидная карта которого представлена на рис. 3.

*Выделение $T(pT)_{14}$.* По аналогии с [8] 200 $OE_{260}$ пентадекануклеотида обрабатывали 18 ч *п*-нитробензальдоксимом при ~20° С, затем раствор упаривали и остаток растворяли в 15 мл 25% водного аммиака и выдерживали 18 ч при ~20° С. После упаривания остаток растворяли в 1 мл 80% уксусной кислоты и нагревали до кипения в течение 10 мин. Продукт выделяли хроматографией на колонке с DE-32-целлюлозой ($Cl^-$, 1,5××15 см) в градиенте концентрации NaCl, pH 7,5 (0→0,5 М, 1 л, скорость

элюции 2 мл/мин) (рис. 2). После обессоливания выделено 98 $OE_{260}$ пентадекатимидилата (XVIII).

Авторы благодарят В. Ф. Зайчикова за проведение анализа олигонуклеотидов методом нуклеотидных карт.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Stawinski J., Hozumi T., Natang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
2. *Дроздова А. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим., 1980, № 2, вып. 1, с. 125–130.
3. *Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим., 1981, № 4, вып. 2, с. 131–138.
4. *van Boom J. H., Burgers P. M. J.* Tetrahedron Lett., 1976, № 52, p. 4875–4878.
5. *Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Семенова Л. Н., Шубина Т. Н.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 735–739.
6. *Adamiak R. W., Banciesewzka M. Z., Biala E., Crseskowiak K., Kierseh R., Kreszewski A., Morkiewicz W. T., Wiewierowski M.* Nucleic Acids Res., 1976, v. 3, № 12, p. 3397–3408.
7. *Tu C. D., Lay E., Bahl C. P.* Anal. Biochem., 1976, № 74, p. 73–93.
8. *Jones S. S., Rayner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M.* Tetrahedron, 1980, v. 36, № 21, p. 3075–3085.

Поступила в редакцию
10.VIII.1981

## SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES GGCCTGTTGGC AND T(pT)$_{14}$ BY PHOSPHOTRIESTER APPROACH USING 5′-*p*-CHLOROPHENYL ESTERS OF APPROPRIATE OLIGONUCLEOTIDE BLOCKS

ZARYTOVA V. F., IVANOVA E. M., KUTYAVIN I. V.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The dodecanucleotide GGCCTGTTTGGC (XI) and pentadecathymidylic acid have been synthesized by the phosphotriester approach using 5′-*p*-chlorophenyl esters of appropriate oligonucleotide blocks. The syntheses of (XI) and T(pT)$_{14}$ were carried out according to the schemes [(2+2)+2]+[(2+2)+2] and [3+(3+3)]+(3+3), respectively. *p*-Chlorophenyl esters of N-acyl-3′-O-levulinucleoside 5′-phosphates (P-component) and β-cyanoethyl, *p*-chlorophenyl esters of N-acylnucleoside-5′-phosphates (OH-component) were used as starting compounds for the syntheses of di- and trinucleotide blocks. Toluenesulfonyltetrazole was used as a coupling reagent with OH and P components taken in equimolar ratio.