



УДК 547.963.32.07

## ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

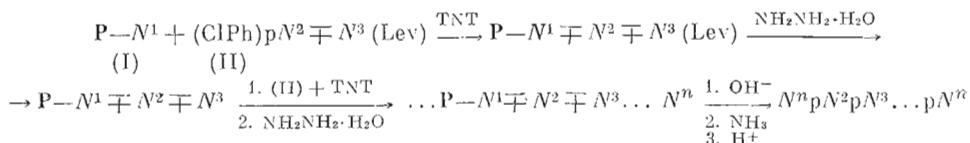
II \*. ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ГЕПТАДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА  
Т-С-А-Т-Т-С-С-Т-Т-А-С-Т-С-Т-Т-С-А ТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАЩИЩЕННЫХ 5'-НУКЛЕОТИДОВ

Амирханов К. В., Ривкин М. И., Кумарев В. П.

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Одной из проблем твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов в триэфирном варианте является доступность исходных защищенных моно-, ди- или тринуклеотидных блоков [1-3].

Нами была исследована возможность блочного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на полимерном носителе модифицированным триэфирным способом [4, 5]. Способ заключается в конденсации связанного с полимером ОН-компонента (I) с Р-компонентом (II), находящимся в растворе, в присутствии конденсирующего агента и последующем удалении левулицильного остатка с концевой 3'-оксигруппы олигонуклеотида на полимере (см. схему).



где Р — полимерный носитель с монометокситритильными якорными группами.

Такой метод позволяет использовать доступные защищенные 5'-нуклеотиды, типа (ClPh)pN(Lev) (III) как готовые мономеры для наращивания цепи на полимере, а также значительно сокращает время и трудоемкость получения исходных ди- или тринуклеотидных блоков в случае блочного синтеза.

По такой схеме путем последовательного присоединения к тимидил(5')-полимеру (I) восьми соответствующих динуклеотидных блоков (II) нами синтезирован гептадекадезоксинуклеотид Т-С-А-Т-Т-С-С-Т-Т-А-С-Т-С-Т-Т-С-А, комплементарный 3'-концевому участку гена лейкоцитарного интерферона человека [6].

В качестве полимерного носителя нами использован привитый на поверхность политетрафторэтилена полистирол с монометокситритильными якорными группами [7]. Соответствующие динуклеотидные блоки (ClPh)panC $\mp$ bzA(Lev), (ClPh)pT $\mp$ T(Lev), (ClPh)pbzA $\mp$ anC(Lev), (ClPh)pT $\mp$ anC(Lev) получены аналогично методикам работы [8], исходя из коммерческих *n*-хлорфениловых эфиров *N*-ацил-3'-О-левулицил-5'-нуклеотидов (III) (отечественного производства). Каждая стадия наращивания на полимерном носителе включала в себя межнуклеотидную конденсацию и удаление левулицильной защитной группы. Все стадии наращивания вели на установке с проточным реактором колоночного типа, исходя из 50 мг тимидил(5')-полимера (5 мкмоль dT). На каждой стадии использовали 30-50 мкмоль соответствующего динуклеотида (II), который вводили в реактор после многократного уравнивания с абсолютным пиридином и

\* Предыдущее сообщение см. [1]. Принятые сокращения: N — N-защищенный нуклеозид; TNT — *n*-толуолсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолид; Lev — левулицильная группа; символом  $\mp$  обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфениловым (ClPh) остатком.

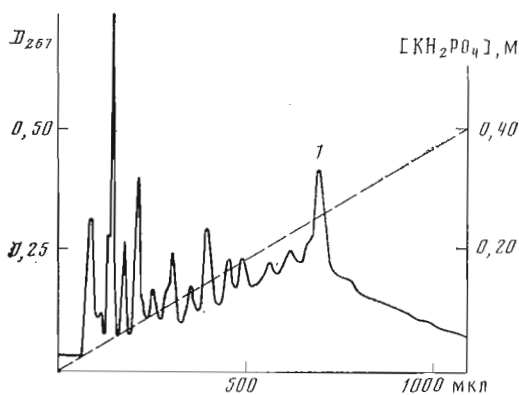


Рис. 1

Рис. 1. Микроколоночная ионообменная хроматография на колонке (1×50 мм) с аминокромом олигонуклеотидной смеси, содержащей гептадекадезоксинуклеотид Т-С-А-Т-Т-С-С-Т-А-С-Т-С-Т-Т-С-А (1), после отщепления от полимера (буфер рН 6,9)

Рис. 2. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированного гептадекадезоксинуклеотида <sup>32</sup>PТСАТТССТТАСТСТТСА фосфодиэстеразой змеиного яда; направление Е — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление Н — гомохроматография в гомосмеси III [11]

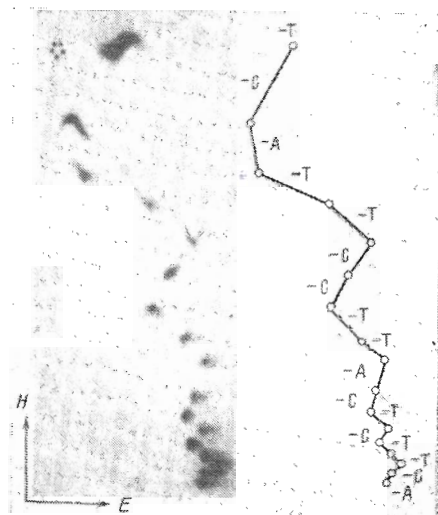


Рис. 2

добавления к нему 1,5–2-кратного избытка конденсирующего агента — *n*-толуолсульфонитризолида. Конденсации проводили в реакторе с полимерным носителем путем циркуляции пиридинного раствора конденсирующего агента и динуклеотида (3 ч, 20° С). Объем раствора при этом составлял 150–200 мкл. После каждой стадии удавалось регенерировать до 50–60% исходного динуклеотида. Левулинильную защитную группу удаляли обработкой полимера 0,5 М гидразингидратом в смеси пиридин — уксусная кислота (3:2) [9] (10 мин, 20° С). *n*-Хлорфенильные остатки с межнуклеотидных фосфатов в конце синтеза удаляли обработкой олигонуклеотидил (5′)-полимера 0,5 М раствором *n*-нитробензальдоксимата лития [10] в смеси пиридин — вода (4:1) (24 ч, 20° С). Аммонолиз проводили 30% NH<sub>3</sub> (15 ч, 50° С). Полностью деблокированные олигонуклеотиды отщепляли от полимера по методике [7]. После каждой стадии наращивания отбирали часть носителя (1–2 мг) для анализа полученной олигонуклеотидной смеси на полимере. Такую смесь после полного деблокирования и отщепления от полимера подвергали микроколоночной хроматографии на аминокроме (рис. 1). Степень превращения на отдельных стадиях колебалась от 60 до 90% (по соотношению последнего и предыдущего пиков на профиле микроколоночной хроматографии).

Целевой олигонуклеотид выделяли препаративной ионообменной хроматографией на аминокроме С-300 (отечественного производства) в градиенте калий-фосфатного буфера (рН 6,9). С 20 мг полимера было отщеплено 140 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидной смеси, из которой выделили 12 ОЕ<sub>260</sub> неочищенного гептадекануклеотида.

Хроматографически и электрофоретически гомогенный продукт получен после ионообменной рехроматографии и последующей обращенно-фазовой хроматографии (силикагель, модифицированный триметилхлорсиланом, градиент — 7–15% ацетонитрил в 0,05 М NH<sub>4</sub>Ac, рН 6,0). Общий выход гептадекадезоксинуклеотида составил 1,8%, считая на исходный тимидин, присоединенный к полимеру, что соответствует в среднем 60% на каждой из 8 стадий, если не учитывать потерь при отщеплении от полимера и деблокировании. Структура гептадекануклеотида доказана определением последовательности оснований по методу нуклеотидных карт [11] (рис. 2).

1. Амирханов Н. В., Кумарев В. П., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 126-129.
2. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185-3191.
3. Edge M. D., Green A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nature, 1981, v. 292, № 5825, p. 756-762.
4. Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1981, № 4, вып. 2, с. 131-138.
5. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карнова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512-1522.
6. Yelverton E., Leung D., Weck P., Gray P. W., Goettel D. V. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 3, p. 731-741.
7. Potarov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041-2056.
8. Дроздова А. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1980, № 2, вып. 1, с. 125-130.
9. van Boom J. H., Burgers P. M. J. Tetrahedr. Lett., 1976, № 52, p. 4875-4878.
10. Reese C. B., Titmas R. C., Yau L. Tetrahedr. Lett., 1978, № 30, p. 2727-2730.
11. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331-353.

Поступило в редакцию  
3.II.1982

**SOLID PHASE SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.  
II. SOLID PHASE SYNTHESIS OF HEPTADECADEOXYRIBONUCLEOTIDE  
T-C-A-T-T-C-C-T-T-A-C-T-C-T-T-C-A BY PHOSPHOTRIESTER METHOD  
USING PROTECTED 5'-NUCLEOTIDES**

AMIRKHANOV N. V., RIVKIN M. I., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The possibility of new solid phase synthesis of oligodeoxynucleotides by modified phosphotriester approach using commercial protected 5'-nucleotides ((ClPh)pN(Lev)) was investigated. Heptadecadeoxynucleotide T-C-A-T-T-C-C-T-T-A-C-T-C-T-T-C-A was synthesized by attachment of corresponding dinucleotide blocks (ClPh)pN(ClPh)pN(Lev) to thymidylate residue bound to polymeric support through its 5'-hydroxyl group. The yield of heptadecanucleotide was 1.8%. Each elongation step consists of: a) coupling the 3'-hydroxyl group of the polymer-bound nucleoside component and the 5'-phosphodiester grouping of the nucleotide component in solution using coupling reagent; b) removal of levulinate protecting groups. 50 mg of polymer support (polystyrene grafted on the surface of polytetrafluoroethylene) was used for the synthesis in micro-column variant. The yield of a single coupling step was 60-90%.