



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ХЛОРОФОРМЕ
ТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ

Зарьтова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. И.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Осуществлен синтез гекса-, ундека- и гексадекануклеотидов (pG-T-G-T-G-T, pT-G-C-T-C-T-G-G-T-T, pC-A-T-G-C-A-A-A-C-C-T-T-C-C) блочным триэфирным методом, исходя из *n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов с использованием в качестве конденсирующего реагента триизопропилбензолсульфохлорида в присутствии *N*-метилимидазола в хлороформе.

Ранее нами было показано, что синтез олигонуклеотидов с использованием арилсульфотетразолидов или арилсульфонитротриазолидов может быть осуществлен с использованием *n*-хлорфениловых эфиров 3'-О-левулинилнуклеозид-5'-фосфатов, не содержащих кислоталабильных защитных групп [1].

Кроме того, было выяснено, что межнуклеотидная триэфирная связь при использовании *n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов и смеси триизопропилбензолсульфохлорида и *N*-метилимидазола эффективно образуется не только в пиридине, но и в хлороформе [2]. Смесь TPS-хлорида и MeIm ранее использовалась при синтезе олигонуклеотидов триэфирным методом исходя из *n*-хлорфениловых эфиров 3'-нуклеотидов в среде пиридина, диоксана и ацетонитрила [3-5].

В настоящей работе на примере синтеза гекса-, ундека- и гексадекануклеотидов развит подход к синтезу олигонуклеотидов в хлороформе с использованием 5'-*n*-хлорфениловых эфиров 3'-О-левулинилнуклеотидов в присутствии смеси TPS-хлорида и MeIm, описанный в работе [2]. Кроме того, показано, что образование межнуклеотидной связи с использованием эфиров 5'-нуклеотидов может быть осуществлено в течение 10-30 мин в ацетонитриле и диоксане.

На первом этапе работы мы сравнили скорость образования межнуклеотидной связи для *n*-хлорфениловых эфиров 3'- и 5'-нуклеотидов в присутствии TPS-хлорида и MeIm в хлороформе. Сравнение проводили по данным ³¹P-ЯМР-спектров реакционных смесей, полученных при взаимодействии (Tr)Tr(ClPh) с T(Ac) и (ClPh)pT(Lev) с (CNEt)₂pT. Отнесение сигналов в спектрах ³¹P-ЯМР проводили в соответствии с работой [6]. За образованием динуклеотидов следили по росту интенсивности сигналов межнуклеотидной фосфотриэфирной группы с химическими сдвигами δ 7,2 и 7,6 м.д. в случае (Tr)T≠T(Ac) и δ 7,2 м.д. в случае (CNEt)₂pT≠T(Lev). Из кинетических кривых накопления динуклеотидов, представленных на рис. 1, видно, что скорости образования межнуклеотидной связи различаются не более чем в 2 раза, что позволяет использовать *n*-хлорфениловые эфиры как 3'-, так и 5'-нуклеотидов.

Далее мы определили оптимальное соотношение между TPS-хлоридом и MeIm. На рис. 2 приведены кинетические кривые образования фосфотриэфира при взаимодействии (CNEt)₂pT, (ClPh)pT(Lev) и TPS-хлорида в присутствии различных количеств MeIm в пиридине. Видно, что скорость образования динуклеотида при использовании 1 экв. MeIm по отношению

Сокращения: TPS-хлорид — 2,4,6-триизопропилсульфохлорид, MeIm — *N*-метилимидазол, ClPh — *n*-хлорфенил, Lev — левулинил, ib — изобутирил, ≠ — межнуклеотидная фосфатная группа, блокированная *n*-хлорфенильным остатком. Префикс d (дезокс) для краткости опущен.

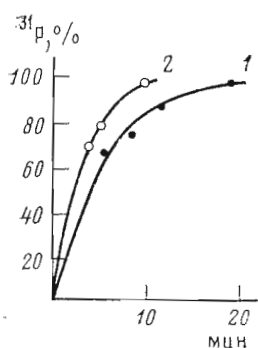


Рис. 1

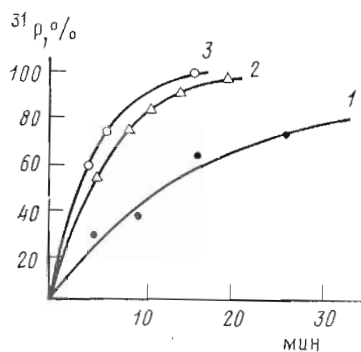


Рис. 2

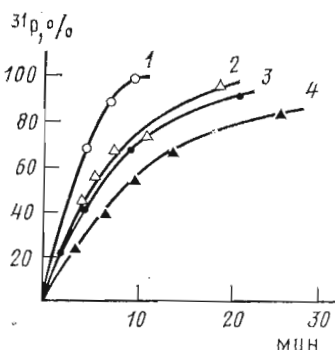


Рис. 3

Рис. 1. Кинетические кривые накопления динуклеотидов при 20° С в хлороформе при взаимодействии 0,1 М (CIPh)pT(Lev) (пиридиневая соль), 0,1 М (CNEt)₂pT, 0,3 М TPS-хлорида и 0,9 М MeIm (1) и 0,1 М (Tr)Tr(CIPh) (пиридиневая соль), 0,1 М T(Ac), 0,3 М TPS-хлорида и 0,9 М MeIm (2)

Рис. 2. Кинетические кривые образования динуклеотида (CNEt)₂pT≡T(Lev) при взаимодействии 0,1 М (CNEt)₂pT, 0,1 М (CIPh)pT(Lev) (пиридиневая соль), 0,3 М TPS-хлорида при 20° С в пиридине в присутствии MeIm в концентрации 0,3 (1), 0,6 (2) и 0,9 М (3)

Рис. 3. Кинетические кривые образования динуклеотида (CNEt)₂pT≡T(Lev) при взаимодействии 0,1 М (CIPh)pT(Lev) (триэтиламмониевая соль) 0,1 М (CNEt)₂pT, 0,3 М TPS-хлорида, 0,6 М MeIm при 20° С в ацетонитриле (1), хлороформе (2), пиридине (3) и диоксане (4)

к TPS-хлориду значительно ниже, чем при использовании 2 экв. MeIm. Это, вероятно, объясняется тем, что часть MeIm расходуется на нейтрализацию образующихся по ходу реакции триизопропилбензолсульфокислоты и соляной кислоты. При увеличении содержания MeIm от 2 до 3 экв. по отношению к TPS-хлориду скорость реакции практически не меняется, поэтому в синтезе олигонуклеотидов мы использовали MeIm и TPS-хлорид в соотношении 2 : 1.

В настоящей работе было проведено также сравнение скорости образования межнуклеотидной связи в пиридине, диоксане, хлороформе и ацетонитриле при использовании *n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов. Из данных, приведенных на рис. 3, видно, что влияние вышеуказанных растворителей на скорость реакции незначительно: в хлороформе образование фосфотриэфира протекает практически так же, как и в пиридине, в диоксане — несколько медленнее, в ацетонитриле — быстрее. Кроме того, при проведении этой реакции в хлористом метиле при использовании тех же концентраций реагентов образование динуклеотида, по данным ТСХ, полностью заканчивается не более чем за 20 мин.

Такая же закономерность скорости образования межнуклеотидной связи в диоксане, пиридине и ацетонитриле получена и в случае использования *n*-хлорфениловых эфиров 3'-нуклеотидов в присутствии смеси TPS-хлорида и MeIm [5].

Из всех исследованных растворителей для проведения олигонуклеотидного синтеза, по нашему мнению, наиболее целесообразно использовать хлороформ, поскольку он удобнее всего в работе (простота очистки, негигроскопичность, негорючесть, возможность исключения ряда стадий при выделении олигонуклеотидного блока).

Синтез олигонуклеотидов pT-G-C-T-C-T-G-G-T-T-T, pC-A-T-G-C-A-A-A-A-C-C-T-T-C-C-C и pG-T-G-T-G-T осуществляли в хлороформе блочным методом по схемам [2+(2+2)]+(2+3), (3+4)+[4+(4+1)] и 2+(2+2) соответственно, исходя из *n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов. Условия синтеза на отдельных стадиях и выходы продуктов приведены в табл. 1—3.

Для блокирования обеих ОН-групп концевой 5'-фосфорильного остатка использовали цианотильные группы [6], 3'-оксигруппа ОН-компонента

была блокирована остатком левулиновой кислоты [7], гетеродуплические основания блокированы обычным способом.

P- и OH-компоненты использовались в соотношениях, близких к эквимолярным. Концентрация P-компонента на всех стадиях составляла ~0,2 М, конденсирующий реагент использовали в трехкратном избытке по отношению к P-компоненту. Реакции проводили в течение 10–20 мин.

Удаление с полностью заблокированного олигонуклеотидного блока цианэтильной группы проводили как описано [8]. OH-компонент после удаления остатка левулиновой кислоты [9] выделяли хроматографией на силикагеле.

Отсутствие водных обработок на протяжении всего цикла позволяет исключить и предварительное высушивание компонентов реакции упариванием с пиридином, заменив его упариванием с хлороформом для удаления следов спирта (если использовали неосажденные компоненты), остающегося после упаривания раствора хроматографически выделенного компонента. Низкая вязкость и хорошая растворимость реакционной смеси в хлороформе дают возможность проводить конденсацию олигонуклеотидных блоков при высокой (0,2 М) их концентрации. Кроме того, использование хлороформа в качестве растворителя позволяет хроматографировать реакционную смесь сразу же после проведения конденсации без предварительных обработок и, таким образом, сокращает время проведения цикла удлинения олигонуклеотидной цепи на одно звено до 1,5 ч.

Полностью деблокированные олигонуклеотиды выделяли понообменной хроматографией. Структуру подтверждали методом нуклеотидных карт по работе [10].

Экспериментальная часть

В работе использовали *n*-хлорфениловые эфиры *N*-ацил-3'-О-левулинилнуклеозид-5'-фосфатов, *n*-хлорфенил- и β-цианэтил-*N*-ацилнуклеозид-5'-фосфаты, ди-(β-цианэтил)-*N*-ацилнуклеозид-5'-фосфаты, триизопропилбензолсульфохлорид (ОХП НИОХ СО АН СССР), *N*-метилимидазол [11], DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия), аминокром АС₃-300 (ИЦиГ СО АН СССР), силикагель Kieselgel 60 (Merck, ФРГ). Хлороформ, перегнанный над P₂O₅, хранили над Al₂O₃. Синтез динуклеотидных блоков осуществляли по методу [2].

Структуру олигонуклеотидов устанавливали фингерпринтированием по методу [10], используя фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1), щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1; СКТБ БАВ Главмикробиопрома, Новосибирск), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), [γ -³²P] АТФ.

ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) проводили в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

Спектры ³¹P-ЯМР записывали на импульсном спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 36,43 МГц. Детали эксперимента см. в работе [6].

Межнуклеотидные конденсации (табл. 1–3). К смеси P- и OH-компонентов в хлороформе добавляли TPS-хлорид и MeIm. За ходом реакции следили по данным ТСХ. После окончания реакции реакционную смесь наносили на колонку с силикагелем (70 мл). Продукт конденсации элюировали градиентом концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 10–15%). Фракции, содержащие целевой олигонуклеотид, объединяли и упаривали.

Удаление β-цианэтильной группы проводили в смеси абсолютного ацетонитрила и триэтиламина (1 : 1) [8], 3'-О-левулинильной группы — по методу [9].

Полное деблокирование олигонуклеотидов проводили, обрабатывая их *n*-нитробензальдоксиматом тетраметилгуанидина при 20°С в течение 20 ч [12]. Раствор упаривали и обрабатывали конц. аммиаком (2 сут, 20°С).

Выделение олигонуклеотидов. Гексануклеотид pG-T-G-T-G-T после деблокирования выделяли хроматографией на колонке (1,5×30 см) с аминокромом АС₃-300 (H₂PO₄⁻) в градиенте концентрации KH₂PO₄—K₂HPO₄ в 30% ацетонитриле, рН 7,5 (0–0,08 М, 1000 мл, 500 мл/ч). Из 4500 ОЕ₂₈₈.

Условия синтеза гексапептида pG-T-G-T-G-T

| Олигонуклеотид | Исходные вещества (ммоль) | | Метил | СНCl ₃ , мл | Время, мин | Выход, % |
|--|---------------------------------|----------------------------------|-------|------------------------|------------|----------|
| | P-компонент | ОН-компонент | | | | |
| (CNEt) ₂ pT≡ibG≡T≡ibG≡T (Lev) | (ClPh)pT≡T (Lev) (0,49) | (CNEt, ClPh) pibG≡T (0,39) | 3,0 | 2,5 | 45 | 80 |
| (CNEt) ₂ pibG≡T≡ibG≡T≡ibG≡T (Lev) | (ClPh) pibG≡T≡ibG≡T (Lev) (0,4) | (CNEt) ₂ pibG≡T (0,4) | 0,3 | 0,5 | 45 | 70 |

Таблица 2

Условия синтеза undекапептида pT-G-C-T-C-T-G-G-T-T

| Олигонуклеотид | Исходные вещества (ммоль) | | TPS-хлорид | Метил | СНCl ₃ , мл | Время, мин | Выход, % |
|--|------------------------------------|--|------------|-------|------------------------|------------|----------|
| | P-компонент | ОН-компонент | | | | | |
| (CNEt, ClPh) pT≡T≡T (Lev) | (ClPh) pT≡T (Lev) (0,9) | (CNEt, ClPh) pT (0,9) | 2,7 | 5,4 | 4,5 | 15 | 70 |
| (CNEt, ClPh) pibG≡ibG≡T≡T≡T (Lev) | (ClPh) pT≡T≡T (Lev) (0,25) | (CNEt, ClPh) pibG≡ibG (0,2) | 0,75 | 1,5 | 10 | 15 | 70 |
| (CNEt, ClPh) panC≡T≡anC≡T (Lev) | (ClPh) panC≡T (Lev) (0,5) | (CNEt, ClPh) panC≡T (0,62) | 1,5 | 3,0 | 2,5 | 15 | 86 |
| (CNEt) ₂ pT≡ibG≡anC≡T≡anC≡T (Lev) | (ClPh) panC≡T≡anC≡T (Lev) (0,43) | (CNEt) ₂ pT≡ibG (0,33) | 1,3 | 2,6 | 3,0 | 15 | 70 |
| (CNEt) ₂ pT≡ibG≡anC≡T≡anC≡T | | | | | | | 75 |
| (CNEt) ₂ pT≡ibG≡anC≡T≡anC≡T≡ibG≡ibG≡T≡T≡T (Lev) | (ClPh) pibG≡ibG≡T≡T≡T (Lev) (0,07) | (CNEt) ₂ pT≡ibG≡anC≡T≡anC≡T (0,055) | 0,21 | 0,42 | 0,5 | 20 | 70 |

Таблица 3

Условия синтеза гексадекануклеотида pC-A-T-G-C-A-A-A-C-T-T-C-C-C

| Олигонуклеотид | Исходные вещества (ммоль) | | MeIm | СНСl ₂ , мл | Время, мин | Выход, % |
|--|--|---|------|------------------------|------------|----------|
| | P-компонент | OH-компонент | | | | |
| (CNEt, ClPh) pT≡T≡anC≡anC≡anC (Lev) | (ClPh) panC (Lev) (0,06) | (CNEt, ClPh) pT≡T≡anC≡anC (0,048) | 0,18 | 0,3 | 15 | 82 |
| (CNEt, ClPh) pbzA≡bzA≡anC≡anC (Lev) | (ClPh) panC≡anC (Lev) (0,09) | (CNEt, ClPh) pbzA≡bzA (0,07) | 0,27 | 0,4 | 10 | 76 |
| (CNEt, ClPh) pbzA≡bzA≡anC≡anC | (ClPh) pbzA≡bzA (Lev) (0,12) | (CNEt, ClPh) pibG≡anC (0,10) | 0,36 | 0,5 | 10 | 75 |
| (CNEt, ClPh) pibG≡anC≡bzA≡bzA≡bzA≡bzA (Lev) | (ClPh) pibC≡anC≡bzA≡bzA (Lev) (0,043) | (CNEt) ₂ panC≡bzA≡T (0,040) | 0,13 | 0,2 | 15 | 50 |
| (CNEt) ₂ panC≡bzA≡T≡ibG≡anC≡bzA≡bzA | (ClPh) pT≡T≡anC≡anC≡anC (Lev) (0,041) | (CNEt, ClPh) pbzA≡bzA≡anC≡anC (0,040) | 0,15 | 0,2 | 15 | 77 |
| (CNEt) ₂ panC≡bzA≡T≡ibG≡anC≡bzA≡bzA≡bzA≡bzA≡bzA≡bzA≡anC≡anC≡anC | (ClPh) pbzA≡bzA≡anC≡anC≡T≡T≡anC≡anC≡anC (Lev) (0,03) | (CNEt) ₂ panC≡bzA≡T≡ibG≡anC≡bzA≡bzA (0,02) | 0,1 | 0,1 | 20 | 85 |

полностью блокированного гексануклеотида было выделено 1250 ОЕ₂₆₀ целевого продукта.

Ундекануклеотид рТ-Г-С-Т-С-Т-Г-Г-Т-Т-Т выделяли хроматографией на колонке (1,5×15 см) с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl⁻) в градиенте концентрации NaCl в 7 м мочевины, рН 7,5 (0—0,35 М, 600 мл, 30,5 мл/ч). После рехроматографии продукта при тех же условиях, но при рН 3,7 получено 420 ОЕ₂₆₀ ундекануклеотида (из 1340 ОЕ₂₆₀ полностью блокированного олигонуклеотида).

Гексадекануклеотид рС-А-Т-Г-С-А-А-А-С-С-Т-Т-С-С-С выделяли хроматографией на колонке (1,5×30 см) с аминохромом АС₃-300 (Н₂РO₄⁻) в градиенте концентрации КН₂РO₄—К₂НРO₄ в 30% ацетонитриле, рН 7,1 (0—0,25 М, 100 мл, 500 мл/ч). Из 1500 ОЕ₂₆₀ полностью блокированного олигонуклеотида было выделено 150 ОЕ₂₆₀ целевого продукта.

Авторы благодарят Д. Г. Кнорре за участие в обсуждении результатов и постоянный интерес к работе и С. А. Грачева за проведение анализа олигонуклеотидов методом нуклеотидных карт.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 224—230.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Докл. АН СССР, 1982, т. 265, № 4, с. 878—881.
3. Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чазмахчева О. Г. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 231—238.
4. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 9, p. 961—964.
5. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 660—666.
6. Дроздова Л. П., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1981, вып. 1, № 2, с. 125—130.
7. Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1981, вып. 1, № 4, с. 131—138.
8. Duchworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Horg G. P., Sing M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691—1706.
9. van Boom X. N., Burgers P. M. L. Tetrahedron Lett., 1976, № 52, p. 4875—4878.
10. Tu C. D., Ley E., Bahl C. P., Wu R. Anal. Biochem., 1976, № 74, p. 73—93.
11. Häring M. Helv. chim. acta, 1959, v. 42, № 6, p. 1845—1846.
12. Jones S. S., Rayner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. Tetrahedron, 1980, v. 36, № 21, p. 3075—3085.

Поступила в редакцию
17.IX.1982

SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BY PHOSPHOTRIESTER APPROACH IN CHLOROFORM

ZARYTOVA V. F., IVANOVA E. M., ROMANENKO V. P.

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

The hexa-, undeca- and hexadecadecoxyribonucleotides (pG-T-G-T-G-T, pT-G-C-T-C-T-G-G-T-T-T, pC-A-T-G-C-A-A-A-A-C-C-T-T-C-C-C) have been synthesized by the phosphotriester approach using 5'-p-chlorophenyl esters of appropriate oligonucleotide blocks in the presence of 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride and N-methylimidazole as condensing agent in chloroform.