



УДК 547.963.32.05 : 577.113.6

НОВЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
С ФОСФАМИДНОЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗЬЮ*Соколова Н. И., Киселева Е. Г., Горжун А. Ф.,
Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Конденсацией смешанных ангидридов дезоксирибонуклеотидов и мезитиленкарбоновой кислоты с 3'-амино-2',3'-дидезокситимидином в водной среде с выходами 80–90% получены аналоги коротких олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие фосфамидную межнуклеотидную связь. Конденсации проходят избирательно, предварительной защиты функциональных групп сахара и гетероциклических оснований не требуется.

В последние годы значительно возрос интерес к аналогам природных олигонуклеотидов, в частности к олигодезоксирибонуклеотидам, в которых один из атомов кислорода в межнуклеотидном фосфате заменен NH-группировкой. По свойствам такие фосфамидные аналоги олигонуклеотидов, с одной стороны, похожи на природные олигомеры, вступают в комплементарные взаимодействия, могут служить праймерами при синтезе ДНК с помощью ДНК-полимеразы [1], «сшиваются» ДНК-лигазой [2]. С другой стороны, наличие фосфамидной связи вместо фосфоэфирной обуславливает специфику этих соединений: они не расщепляются в стандартных условиях фосфодиэстеразами и поэтому могут использоваться в качестве субстратоподобных ингибиторов ряда эндонуклеаз и рестриктаз.

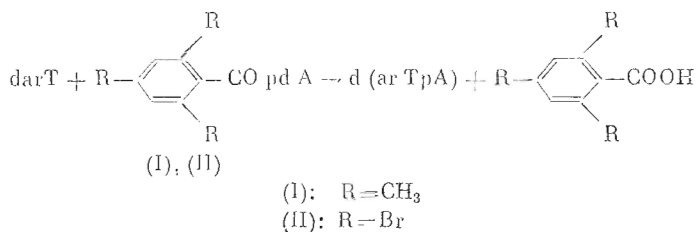
Химический синтез фосфамидных аналогов олигонуклеотидов представляется более простым, чем синтез природных олигомеров, так как благодаря различиям в нуклеофильности алифатических амино- и оксигрупп конденсацию аминоклетидов с активированным нуклеотидным компонентом можно проводить в водной среде без предварительной защиты не участвующих в реакции функциональных групп нуклеозидов. В зависимости от положения атома азота в межнуклеотидном узле ($P3' \rightarrow N5'$ или $N3' \rightarrow P5'$) фосфамидные аналоги олигонуклеотидов можно разделить на две группы. Развитие методов синтеза этих соединений в значительной мере лимитируется сложностью получения исходных аминоклетидов. Синтез соединений первой группы более разработан, поскольку 5'-аминонуклеозиды значительно доступнее, чем их 3'-аналоги. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, относящихся ко второй группе, начал развиваться только в последние годы после разработки препаративных методов синтеза 3'-амино-2',3'-дидезоксирибонуклеозидов [3]. При получении первых коротких олигодезоксинуклеотидов, содержащих $N3' \rightarrow P5'$ -фосфамидные межнуклеотидные связи, для активации нуклеотидного компонента были использованы N,N'-карбонилдиимидазол или водорастворимый карбодимид [4].

В настоящем сообщении в развитие этих работ предлагается новый метод синтеза олигодезоксинуклеотидов с $N3' \rightarrow P5'$ -фосфамидной связью, основанный на активации нуклеотидного компонента через смешанные ангидриды со стерически затрудненными ароматическими кислотами.

Ранее нами было показано [5], что смешанные ангидриды нуклеотидов с мезитиленкарбоновой или 2,4,6-трибромбензойной кислотой являются фосфорилирующими агентами. Фосфорилирование сильных нуклеофилов,

Сокращения: darT – 3'-амино-2',3'-дидезокси-β-D-рибофуранозилтимин, DMAP – 4-диметиламинопиридин, MeIm – 1-метилимидазол.

таких, как амины с $pK \geq 8,5$, эффективно проходит не только в органической, но и в водной среде. Слабые нуклеофилы, например спирты в водной среде, со смешанными ангидридами совсем не реагируют. Поэтому можно было надеяться, что в водной среде смешанные ангидриды нуклеотидов и стерически затрудненных ароматических кислот будут избирательно фосфорилировать 3'-аминогруппы 3'-аминонуклеозидов с образованием соответствующих динуклеозидфосфатов, содержащих фосфамидную $N3' \rightarrow P5'$ -межнуклеотидную связь. Оптимальные условия этой реакции отработались на примере синтеза $d(arTrA)$. Реакцию проводили по схеме



3'-Амино-2',3'-дидезокси-β-D-рибофуранозилтимин ($darT$), использованный в качестве нуклеозидного компонента, получали модификацией тимидина по методу [6]. Вместо ангидрида метансульфокислоты, предложено ранее для активации 3'-гидроксильной группы тимидина при замыкании 2,3'-ангидроцикла, был использован ангидрид трифторметансульфокислоты. Применение этого высокорекреационноспособного соединения позволило ускорить синтез 3'-аминотимидина: так, из $(\text{MeOTr})dT$ в одну стадию с 80% выходом был получен 5'-О-монометокситритил-2,3'-ангидро-2'-дезокситимидин, являющийся ключевым соединением этого синтеза. Методом титрования было установлено, что для 3'-аминогруппы $darT$ $pK_a = 8,35$. Нуклеотидный компонент — pdA — активировали через смешанные ангидриды с мезитиленкарбоновой или 2,4,6-трибромбензойной кислотой по описанной ранее методике [7]. В связи с необходимостью депротонирования 3'-аминогруппы $darT$ конденсацию его со смешанными ангидридами нуклеотида проводили в буферных растворах при pH 8,5–9. Дальнейшее повышение щелочности среды нецелесообразно из-за значительного ускорения при $pH > 9$ гидролиза смешанных ангидридов. Однако в водном пиридине или в буфере (pH 9) через 20 ч выход $d(arTrA)$ достигал лишь 20% и повышение температуры реакционной смеси до 50°С не привело к его существенному увеличению. Эффективность конденсации удалось значительно повысить добавлением к реакционной смеси N,N' -диметиламинопиридина или 1-метилмизазола, способствующих образованию соответствующих ацильных катионов [8]. При сравнении каталитической активности этих соединений оказалось, что MeIm более эффективен, чем DMAP . Например, выход $d(arTrA)$ из $darT$ и смешанного ангидрида pdA с мезитиленкарбоновой кислотой (I) в присутствии MeIm (37°С, pH 9) через 8 ч составлял 95%, а в присутствии DMAP в тех же условиях — лишь 30%. При использовании в качестве нуклеотидного компонента смешанного ангидрида pdA с 2,4,6-трибромбензойной кислотой (II) в присутствии MeIm (37°С, pH 9) выход $d(arTrA)$ через 4 ч достигал 90%, а в присутствии DMAP — 20%.

Кроме катализаторов для определения оптимальных условий синтеза $d(arTrA)$ варьировали соотношение реагентов и температуру реакции.

При синтезе амидов нуклеотидов обычно используется многократный избыток амина по отношению к смешанному ангидриду, получаемому из нуклеотида [5]. При синтезе же олигонуклеотидов с межнуклеотидной фосфамидной связью соотношение компонентов должно быть обратным. Это связано, во-первых, с труднодоступностью аминонуклеозидов и, во-вторых, с протекающей параллельно конденсации в щелочной среде побочной реакцией гидролиза смешанных ангидридов. Оптимальным при синтезе $d(arTrA)$ оказались соотношения (I) : $darT = 3 : 1$ и (II) : $darT = 4 : 1$. Следует отметить, что синтез $d(arTrA)$ проходит значительно быстрее при использовании для активации нуклеотидного компонента более сильного,

Условия синтеза и некоторые характеристики олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих N3' → P5'-межнуклеотидные связи

Полученные соединения	Выход, %	Условия синтеза			R _f	U _{отн} *	λ _{макс.} нм
		температура, °C	катализатор	время, ч			
d(arTpA)	95	50	MeIm	4	0,40	0,48	263
d(arTpC)	90	50	DMAP	4	0,48	0,52	270
d(arTpG)	82	37	MeIm	8	0,35	0,50	264
d(arTpApC)	75	50	MeIm	8	0,19	0,70	268

* Измерена относительно pдA.

чем мезитиленкарбоновая 2,4,6-трибромбензойной кислоты, что согласуется с данными, полученными при синтезе амидов нуклеотидов [7]. Однако практически смешанные ангидриды нуклеотидов с 2,4,6-трибромбензойной кислотой менее удобны, чем их мезитиленкарбоновые аналоги, так как получать их следует непосредственно перед использованием, поскольку они плохо хранятся и быстро гидролизуются.

Синтезы d(arTpA) проводили параллельно при 20, 37 и 50° C. Из реакционных смесей через каждые 2 ч отбирали аликвоты, которые анализировали методом хроматографии на бумаге. При использовании в качестве нуклеотидного компонента смешанного ангидрида (I) повышенные температуры реакции до 50° C не вызывает побочных процессов и позволяет вдвое сократить время синтеза d(arTpA). Для конденсации darT с соединением (II) оптимальной оказалась температура 37° C. При 50° C выход d(arTpA) падает, что, очевидно, объясняется тем, что смешанный ангидрид (II) значительно более реакционноспособен, чем ангидрид (I), и быстрее гидролизуются.

Оптимальные условия, установленные при синтезе d(arTpA), были использованы для получения других олигодезоксирибонуклеотидов. Нуклеотидные компоненты — pdC, pdG и d(pApC) — активировали через смешанные ангидриды с мезитиленкарбоновой кислотой. Выходы, условия синтеза и некоторые характеристики полученных соединений приведены в таблице.

Для подтверждения структуры полученных соединений гидролизывали фосфодиэстеразой змеиного яда. В стандартных условиях (3 ч, 37° C) гидролизывалось 32% d(arTpA), соотношение darT/pдA в гидролизате близко к единице. d(arTpC) и d(arTpG) гидролизывались также не полностью.

Таким образом, предложенный метод синтеза в водных растворах аналогов дезоксирибоолигонуклеотидов, содержащих фосфамидные межнуклеотидные связи, характеризуется простотой эксперимента, отсутствием побочных реакций и высокими выходами целевых продуктов. Все это дает основания для дальнейшей его разработки с целью получения более длинных олигомеров, относящихся не только к дезоксирибо-, но и к риборяду.

Экспериментальная часть

Хроматографию проводили на бумаге FN-1 в системе этанол — 1 М ацетат аммония (7:3). Вертикальный электрофорез проводили 1,5 ч на бумаге FN-3 в 0,05 М ТЕАВ (рН 7,5) при напряжении 900 В. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР), ИК-спектры — на приборе UR-20 (ГДР). pK_a аминогруппы, 2',3'-дидезокси-3'-аминорибозилтимина определяли на автоматическом титраторе Radiometer (Дания). В работе использовали ангидрид трифторметансульфокислоты, DMAP и MeIm (Merck, ФРГ), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Worthington, Англия). Смешанные ангидриды pдA, pдC, pдG и d(pApC) с мезитиленкарбоновой или трибромбензойной кислотами получали по описанной ранее методике [5]. Гидролизы фосфодиэстеразой змеиного яда проводили по методике [9].

5'-О-Монометокситригил-2,3'-ангидротимидин. К охлажденной до -10° C смеси 0,44 мл абс. пиридина и 32 мл дихлорэтана при перемешива-

нии добавляли раствор 1,36 г (4,8 ммоль, 0,8 мл) хлорангидрида трифторметансульфоновой кислоты в 8 мл абс. дихлорэтана, а затем раствор 2,06 г (4 ммоль) $d(\text{MeOTr})\text{T}$ в 6 мл дихлорэтана. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при температуре от -10°C до 0°C , затем добавляли 50 мл 5% NaHCO_3 . Через 20 мин смесь экстрагировали хлороформом (3×50 мл) и экстракт промывали водой (2×70 мл). Хлороформный экстракт сушили над Na_2SO_4 , упаривали до малого объема и наносили на колонку (3×20 см) с силикагелем L 40/100 (ЧССР). Колонку промывали хлороформом, продукт элюировали смесью хлороформ — этанол (95 : 5). Выход 80%. При ТСХ на силуфол в системе хлороформ — этанол (95 : 5) $R_f=0,4$. УФ-спектр (этанол): плечи при λ_{230} и λ_{250} , $A_{230}/A_{270}=1,7$. В ИК-спектре отсутствует полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ при 1700 см^{-1} .

3'-Амино-2',3'-дидезоксирибозилтимин получали из ангидропроизводного в соответствии с методикой [6].

Синтез дезоксиолигонуклеотидов с фосфамидной межнуклеотидной связью (общая методика). К водному раствору, содержащему 6–8 мкмоль смешанного ангидрида нуклеотида с мезитиленкарбоновой или 2,4,6-трибромбензойной кислотой, добавляли 2 мкмоль (20 ОЕ) 3'-амино-2',3'-дидезоксирибозилтимина, растворитель отгоняли на ротонном испарителе, остаток растворяли в 0,12 мл боратного буфера (рН 8,5–9) и добавляли 1 мкмоль катализатора (DMAP или MeIm). Смеси инкубировали 20 ч в термостате при 20, 37 или 50°C , отбирая аликвоты объемом 3 мкл через каждые 2 ч, и хроматографировали на бумаге. Для расчета выходов УФ-поглощающие полосы элюировали и измеряли их оптические плотности. Результаты экспериментов представлены в таблице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Letsinger R. L., Wilkes J. S., Dumas L. B. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 1, p. 292–293.
2. Letsinger R. L., Harke B., Petersen G. R., Dumas L. B. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 3, p. 1053–1063.
3. Azhayev A. V., Ozols A. M., Bushnev A. S., Dyatkina N. B., Kochetkova S. V., Victorova L. S., Kukhanova M. K., Kravetsky A. A., Gottikh B. P. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 2, p. 625–643.
4. Ажаев А. В., Озолс А. М., Краевский А. А., Глущев Н. В., Готтух Б. П. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1218–1224.
5. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 3, № 4, p. 903–916.
6. Horwitz J. P., Chua J., Noel M. J. Org. Chem., 1964, v. 29, № 7, p. 2076–2078.
7. Третьякова С. С., Соколова Н. И., Рисник В. М., Петушкова Е. В., Шабарова З. А. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1218–1223.
8. Höfle G., Steglich W., Vorbrüggen H. Angew. Chem., 1978, B. 17, № 8, S. 569–575.
9. McCutchan T. F., Gilham P. T. Biochemistry, 1973, v. 12, № 24, p. 4840–4846.

Поступила в редакцию
28.VI.1983

A NEW METHOD FOR SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES WITH PHOSPHOAMIDE INTERNUCLEOTIDE BOND

SOKOLOVA N. I., KISELEVA E. G., GORKUN A. F., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Short oligodeoxyribonucleotides ($d\text{T}_{\text{NP}}\text{A}$, $d\text{T}_{\text{NP}}\text{C}$, $d\text{T}_{\text{NP}}\text{G}$, $d\text{T}_{\text{NP}}\text{ApC}$) were synthesized in high yield by condensation of mixed anhydrides of deoxynucleotides and mesitoic acid with 2',3'-dideoxy-3'-aminothymidine. The condensation is carried out in aqueous media and requires no protection of functional groups either of sugars, or heterocyclic bases.