



УДК 547.963.32.057:577.113.4

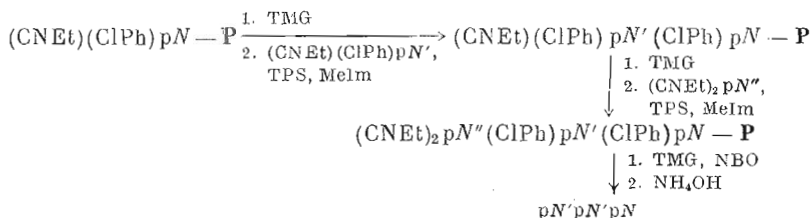
## УНИФИЦИРОВАННЫЙ ВАРИАНТ ТВЕРДОФАЗНОГО ТРИЭФИРНОГО СИНТЕЗА 5'-ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ НА ОСНОВЕ β-ЦИАНЭТИЛОВЫХ *n*-ХЛОРФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ N-АЦИЛНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТОВ

*Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В.*

*Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Предложен унифицированный вариант твердофазного триэфирного метода синтеза олигодезоксинуклеотидов со свободной 5'-фосфатной группой на основе блоков вида (CNEt)(ClPh)pN. С использованием методов <sup>31</sup>P-ЯМР и ионообменной хроматографии в микромасштабе подобраны условия для быстрого и полного деблокирования, включающие в себя обработку защищенного олигодезоксинуклеотида, связанного с полимерным носителем, последовательно 0,33 M Bu<sub>4</sub>NF в 50% водном пиридине, затем концентрированным водным аммиаком. Установлено, что при такой процедуре резко снижается степень разрыва межнуклеотидных связей по сравнению со стандартной обработкой концентрированным водным аммиаком.

Недавно был предложен метод твердофазного триэфирного синтеза олигодезоксинуклеотидов, заключающийся в конденсации 5'-фосфатной группы Р-компонента, присоединенного к полимерному носителю, с 3'-оксигруппой ОН-компонента, находящегося в растворе [1, 2] (см. схему).



Существенным недостатком предложенной схемы является необходимость использования на конечном этапе синтеза нестандартных блоков (CNEt)<sub>2</sub>pN, чтобы после полного деблокирования получать олигодезоксинуклеотиды со свободной 5'-фосфатной группой. Без этого дополнительного приема после деблокирования получаются олигодезоксинуклеотиды с 5'-*n*-хлорфенилфосфатной группой.

В настоящей работе найдены условия быстрого деблокирования, позволяющие осуществлять селективное удаление сначала 5'-*n*-хлорфенильной, а затем 5'-β-цианэтильной защитных групп. Тем самым обеспечена возможность синтеза олигодезоксинуклеотидов с 5'-фосфатной группой исключительно на основе стандартных блоков вида (CNEt)(ClPh)pN.

На первом этапе работы были подобраны оптимальные условия удаления *n*-хлорфенильной защитной группы на примере (CNEt)(ClPh)pibG-(ClPh)panC(Lev).

Навеску динуклеотида обрабатывали раствором тетрабутиламмоний-фторида. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты и оставшиеся защитные группы удаляли обработкой динуклеотида 26% водным аммиаком в стандартных условиях (см.

Принятые сокращения: ClPh – *n*-хлорфенил, TPS – 2,4,6-триизопропилбензол-сульфонилхлорид, MeIm – *N*-метилимидазол, CNEt – β-цианэтил, Lev – левулинил, N – защищенный по основанию нуклеозид, THF – тетрагидрофуран, TMG – тетраметил-гуанидин, NBO – *n*-нитробензальдоксимат. Префикс «d» (дезокси) всюду опущен, так как в статье упоминаются только нуклеотиды дезоксирибы.

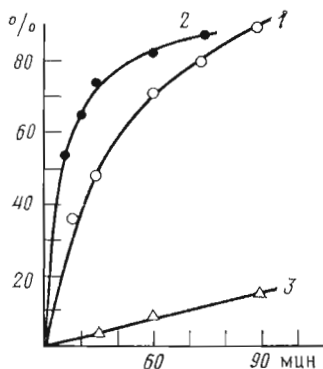


Рис. 1

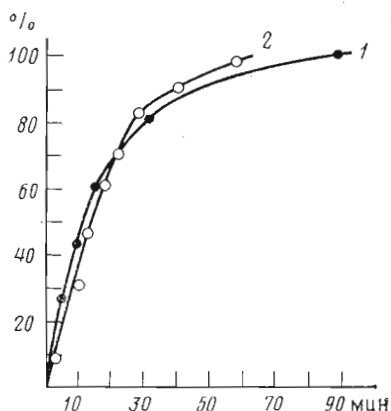


Рис. 3

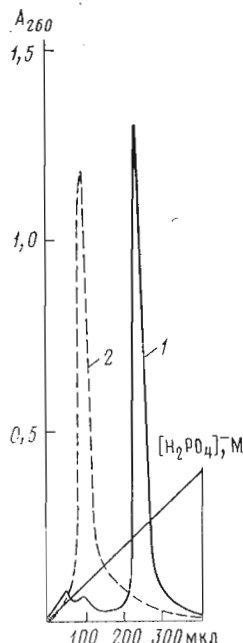


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые реакций удаления концевой 5'-*n*-хлорфенильной группы у (CNEt)(ClPh)pibG(ClPh)panC(Lev) при обработке 0,017 М  $Bu_4NF$  в системе THF — пиридин — вода, 8 : 1 : 1, рН 7,0; 37° С (1); 0,13 М  $Bu_4NF$  в системе THF — пиридин — вода, 3 : 1 : 1, рН 6,8; 37° С (2) и при обработке (CNEt)(ClPh)pibG(ClPh)panC—P 0,33 М  $Bu_4NF$  в 50% водном пиридине, рН 6,8; 37° С (3). Концентрация олигонуклеотидов в реакционной смеси во всех случаях была 5 мМ. По оси ординат приведен выход деблокированного продукта, определенный на основании хроматографических данных (см. «Экспер. часть»)

Рис. 2. Микроколоночная ионообменная хроматография реакционных смесей после деблокирования защитных групп (CNEt)(ClPh)pT с использованием  $Bu_4NF$  (1) и без его применения (2). Элюент — калий-фосфатный буфер, рН 6,5; скорость элюции 50 мкл/мин

Рис. 3. Кинетические кривые реакций удаления концевой (1) и межнуклеотидной (2) *n*-хлорфенильной защитной группы у (CNEt)(ClPh)pT и (CNEt)<sub>2</sub>pzbA(ClPh)panC соответственно при обработке 0,33 М  $Bu_4NF$  в 50% пиридине, рН 6,8; 37° С. Выход деблокированного продукта (ось ординат) определен на основании данных ЯМР (см. «Экспер. часть»)

«Экспериментальную часть»). Кинетические кривые строили на основании результатов анализа реакционных смесей методом ионообменной микроколоночной хроматографии.

Из данных рис. 1, 1 видно, что в условиях, предложенных авторами работы [3] (0,017 М  $Bu_4NF$  в растворе THF — пиридин — вода, 8 : 1 : 1, рН 7,0), скорость удаления *n*-хлорфенильной группы весьма низка, и за 65 ч реакция прошла лишь на 73%. Нами были найдены условия гораздо более быстрого удаления *n*-хлорфенильной группы в системе 0,13 М  $Bu_4NF$  в растворе THF — пиридин — вода, 3 : 1 : 1, рН 6,8 (рис. 1, 2). В более щелочных условиях (рН 8,0) деблокирование происходит столь же быстро, но только на 30%. Это объясняется тем, что в этих условиях с высокой скоростью начинает идти параллельная реакция отщепления

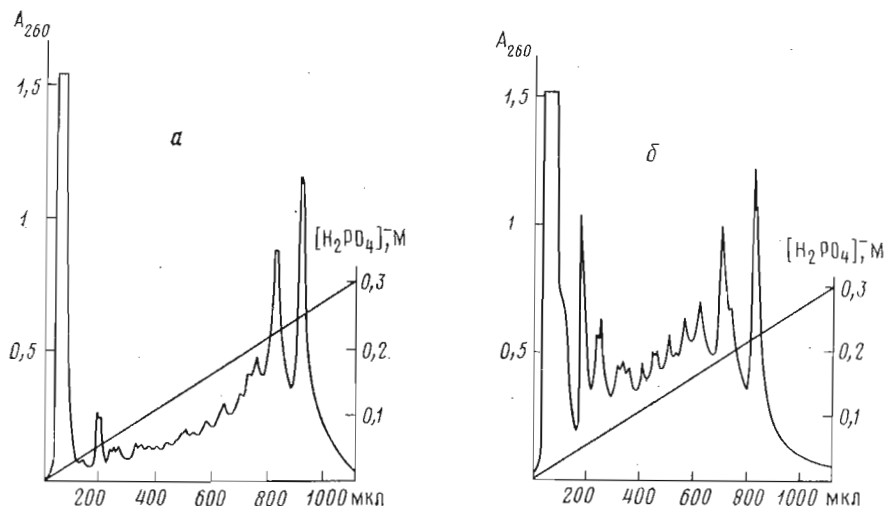


Рис. 4. Микроколоночная ионообменная хроматография реакционных смесей после деблокирования защитных групп декануклеотида рАТТ-САСА в стандартных условиях с использованием  $\text{Bu}_4\text{NF}$  (а) и без его применения (б). Элюент — калий-фосфатный буфер, pH 7,1; скорость элюции 100 мкл/мин

$\beta$ -цианэтильной защитной группы по механизму  $\beta$ -элиминирования, в результате нуклеофильная атака по атому фосфора резко осложняется в связи с появлением отрицательного заряда на 5'-фосфатной группе.

Наиболее быстро удаление 5'-*n*-хлорфенильной группы происходит в буфере 0,33 М  $\text{Bu}_4\text{NF}$  в 50% водном пиридине, pH 6,8. В данном случае за ходом реакции следили по изменению сигналов в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, а в качестве модельных соединений использовали  $(\text{CNet})(\text{ClPh})\text{pT}$  и  $(\text{CNet})_2\text{panC}(\text{ClPh})\text{pbzA}$ . В случае  $(\text{CNet})(\text{ClPh})\text{pT}$  в начальный момент времени в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР регистрируются сигналы двух его диастереоизомеров в области -7,5 м.д., характерной для арил-алкиловых эфиров нуклеозид-5'-фосфатов [4, 5]. По ходу реакции наблюдалось уменьшение интенсивности сигналов исходного соединения до полного исчезновения и увеличение интенсивности сигнала продукта реакции при -0,99 м.д., что по величине химического сдвига согласуется с ожидаемым значением для алкилового эфира нуклеозид-5'-фосфата [4, 5]. По окончании реакции смесь дополнительно анализировали методом ионообменной микроколоночной хроматографии после деблокирования оставшихся защитных групп 26% раствором водного аммиака при 50° С (рис. 2, 1). В контрольном эксперименте  $(\text{CNet})(\text{ClPh})\text{pT}$  обрабатывали концентрированным аммиаком в стандартных условиях (без применения  $\text{Bu}_4\text{NF}$ ) (рис. 2, 2). Видно, что в последнем случае основной пик поглощения приходится на продукт реакции с зарядом (-1), что соответствует  $(\text{ClPh})\text{pT}$ , тогда как в первом случае в результате реакции образуется продукт, который по своим характеристикам соответствует рТ.

В случае динуклеотида  $(\text{CNet})_2\text{panC}(\text{ClPh})\text{pbzA}$  в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР были зарегистрированы две группы сигналов: в области -2,6 м.д., характерной для алкиловых эфиров триэфиров органических фосфатов, и в области -8,0 м.д., характерной для ариловых эфиров по межнуклеотидному атому фосфора [4, 5]. После обработки динуклеотида раствором  $\text{Bu}_4\text{NF}$  наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала при -8,0 м.д. до полного его исчезновения и появление нового сигнала в области резонанса межнуклеотидных диэфирных фосфатов при 1,06 м.д., т. е. происходило удаление межнуклеотидной *n*-хлорфенильной защитной группы. В то же время интенсивность сигнала при -2,6 м.д. в процессе реакции оставалась неизменной, т. е. в данных условиях не происходило удаления цианэтильных защитных групп по концевому фосфату. Таким образом, данные

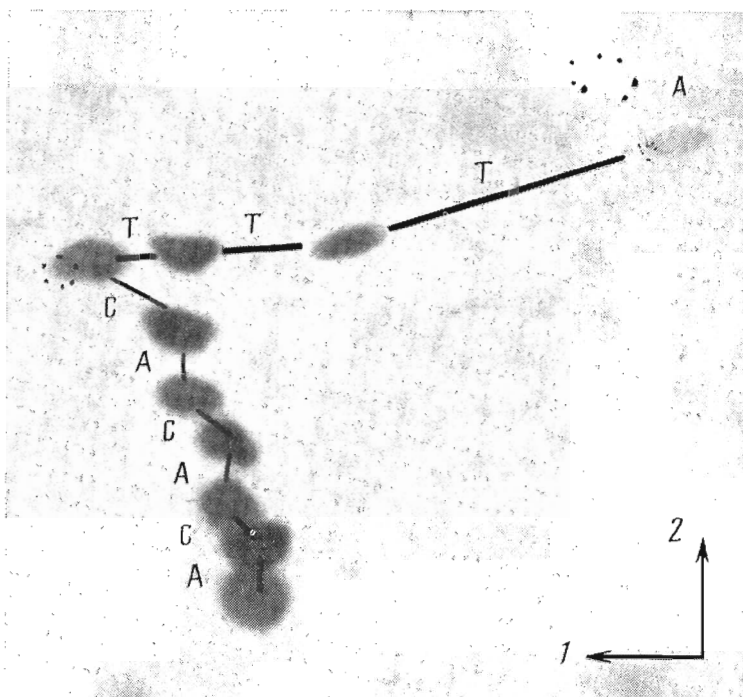


Рис. 5. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза декануклеотида  $[5'-^{32}\text{P}]\text{pATTTCASACA}$  фосфодиэстеразой змеиного яда. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление 2 — гомохроматография

эксперимента позволяют предположить, что в подобранных нами условиях (0,33 М  $\text{Bu}_4\text{NF}$  в 50% пиридине, рН 6,8; 37° С) алкиловые фосфоэфирные группы стабильны и, следовательно, обработка олигонуклеотидов фторид-ионом в этих условиях не должна приводить к разрыву межнуклеотидных связей.

Кинетические кривые реакций деблокирования концевой и межнуклеотидной *n*-хлорфенильной группы для  $(\text{CNEt})(\text{ClPh})\text{pT}$  и  $(\text{CNEt})_2\text{panC}(\text{ClPh})\text{pbzA}$  соответственно, полученные по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, показаны на рис. 3.

Для того чтобы оценить эффективность деблокирования олигонуклеотидов, присоединенных к твердофазному носителю, мы обработали в указанных выше условиях динуклеотид  $(\text{CNEt})(\text{ClPh})\text{pibG}(\text{ClPh})\text{panC}$ , присоединенный за 3'-оксигруппу к полистирольному носителю, привитому на поверхность политетрафторэтилена [2] (емкость по динуклеотиду составляла 180 мкмоль на 1 г носителя). Как видно из рис. 1, 3, скорость реакции деблокирования в гетерогенном варианте лишь немного ниже, чем в гомогенном (ср. с рис. 1, 2).

Наконец, мы осуществили синтез декануклеотида  $\text{pATTTCASACA}$  твердофазным триэфирным методом по схеме, предложенной в работе [2]. Было проведено 9 стадий конденсаций только с мононуклеотидами типа  $(\text{CNEt})(\text{ClPh})\text{pN}$ . После завершения синтеза часть полимера с присоединенным олигонуклеотидом (10 мг) была деблокирована раствором 26% водного аммиака (5 ч, 50° С), а оставшуюся часть полимера (40 мг) обработали 0,33 М  $\text{Bu}_4\text{NF}$  в водном пиридине (3 ч, 37° С), а затем концентрированным водным аммиаком (5 ч, 50° С). На рис. 4 приведены профили ионообменной хроматографии этих смесей в микромасштабе. Видно, что в контрольной смеси последний пик имеет меньший заряд (так как декануклеотид содержит 5'-*n*-хлорфенильную группу), чем в смеси, обработанной  $\text{Bu}_4\text{NF}$ . При этом в последнем случае образовалось гораздо меньше пиков с зарядами менее 10, т. е. предварительная обработка олигонуклеотидов  $\text{Bu}_4\text{NF}$ , при которой происходит селективное удаление *n*-хлорфенильных защитных групп, позволяет снизить количество разрывов меж-

нуклеотидных связей. Декануклеотид был выделен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, помечен с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и анализирован методом нуклеотидных карт (рис. 5).

Таким образом, в настоящей работе найдены условия быстрого и селективного удаления концевой и межнуклеотидной *n*-хлорфенильных защитных групп. Метод может оказаться полезным также и для синтеза олигонуклеотидов со свободной 3'-фосфатной группой, которые нашли применение в ряде исследований (см., например, [6, 7]).

### Экспериментальная часть

В работе использованы защищенные мононуклеотиды, а также (CNEt)(ClPh)ribG(ClPh)panC(Lev), (CNEt)<sub>2</sub>panC(ClPh)pbzA и TPS (препараты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР), *N*-метилимидазол (Ega, ФРГ), аминсилохром АС<sub>111</sub>-300 (ИЦиГ СО АН СССР).

Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>; отрицательные значения химических сдвигов соответствуют более сильному полю, чем Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>. Ионообменную хроматографию в микромасштабе осуществляли на хроматографе «Обь-4» (производство опытного завода СО АН СССР) на колонке с аминсилохромом АС<sub>111</sub>-300 (1×50 мм). Поглощение элюатов при препаративном выделении олигонуклеотидов регистрировали с помощью проточного денситометра Uvicord S (LKB, Швеция).

Твердофазный синтез декануклеотида рАТТТСАСАСА проводили по методике, описанной в работе [2]. Однако на последней стадии конденсации использовали не (CNEt)<sub>2</sub>pbzA, а (CNEt)(ClPh)pbzA.

#### *Кинетические исследования реакции удаления n-хлорфенильных защитных групп*

а) *Методом ионообменной хроматографии в микромасштабе*: 5 мкмоль динуклеотида (CNEt)(ClPh)ribG(ClPh)panC(Lev), свободного или связанного с полимерным носителем, обрабатывали 1 мл соответствующего раствора Вu<sub>4</sub>NF (см. подпись к рис. 1) при 37° С, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (или порции полимера) и реакцию останавливали добавлением 2 мл конц. аммиака. Удаление защитных групп гетероциклических оснований, 5'-концевых β-диаэтильных и оставшихся межнуклеотидных *n*-хлорфенильных защитных групп проводили дальнейшим выдерживанием проб при 50° С в течение 6 ч. После упаривания аммиака каждую пробу растворяли в воде и анализировали методом ионообменной хроматографии в микромасштабе (рис. 2). В качестве контролей использовали рGrC, а также (ClPh)рGrC, который получали обработкой исходного динуклеотида (CNEt)(ClPh)ribG(ClPh)panC(Lev) конц. водным аммиаком в стандартных условиях без использования Вu<sub>4</sub>NF.

Хроматографический анализ проб показал наличие в реакционной смеси двух основных соединений, относительные количества которых менялись по ходу реакции. Первое из них по своим спектральным и хроматографическим характеристикам полностью совпадало с (ClPh)рGrC, второе было идентифицировано как рGrC.

Кинетические кривые реакции деблокирования концевой *n*-хлорфенильной защитной группы строили на основании количеств исходного соединения ( $C_{\text{исх}}$ ) и продукта реакции ( $C_{\text{п}}$ ) в определенные моменты времени, определяя выход деблокированного продукта по формуле  $C_{\text{п}}/(C_{\text{исх}}+C_{\text{п}})$ .

б) *Методом <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии*: 75 мкмоль (CNEt)(ClPh)рГ или (CNEt)<sub>2</sub>panC(ClPh)pbzA помещали в ампулу диаметром 10 мм и обрабатывали 1,5 мл 0,33 М раствора Вu<sub>4</sub>NF в 50% пиридине (рН 6,8) при 37° С и через определенные промежутки времени записывали спектры <sup>31</sup>P-ЯМР. Количественную обработку проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей сигналов исходного соединения и продукта реакции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Горн В. В., Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. Ф. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1511-1517.
2. Горн В. В., Зарытова В. Ф. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 808-814.
3. Miller P. S., Cheng D. M., Dreon N., Jayaraman K., Kan L.-S., Leutzinger E. E., Pulford S. M., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1980, v. 19, № 20, p. 4688-4698.
4. Лебедев А. В., Резвухин А. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149-185.
5. Lebedev A. V., Rezvukhin A. I. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 14, p. 5547-5566.
6. Громова Е. С., Виноградова М. Н., Елов А. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, вып. 2, с. 370-381.
7. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 394-400.

Поступила в редакцию  
2.XI.1984  
После доработки  
14.XII.1984

### GENERAL SCHEME OF THE SOLID-PHASE PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF 5'-PHOSPHORYLATED-OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES ON THE BASIS OF $\beta$ -CYANOETHYL *p*-CHLOROPHENYL ESTERS OF N-ACYLNUCLEOSIDE-5'-PHOSPHATES

BAUSK E. V., GORN V. V., LEBEDEV A. V.

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

A general scheme of the solid-phase phosphotriester method of synthesis of the oligodeoxyribonucleotides with 5'-phosphate group is proposed on the basis of the standard blocks (CNEt) (ClPh)pN. Conditions for rapid and full deprotection of oligodeoxyribonucleotides are developed using the  $^{31}\text{P}$ -NMR and liquid chromatography methods. These conditions involve treatment of protected oligodeoxyribonucleotides (bound with polymer support) with 0,33 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in 50% aqueous pyridine (pH 6,8) and the further treatment with concentrated ammonium hydroxide. The pretreatment with tetra-*n*-butylammonium fluoride is found to decrease considerably the extent of cleavage of internucleotide bonds as compared with the standard treatment with concentrated ammonium hydroxide.