



УДК 577.113.6 : 542.95

© 1990 г.

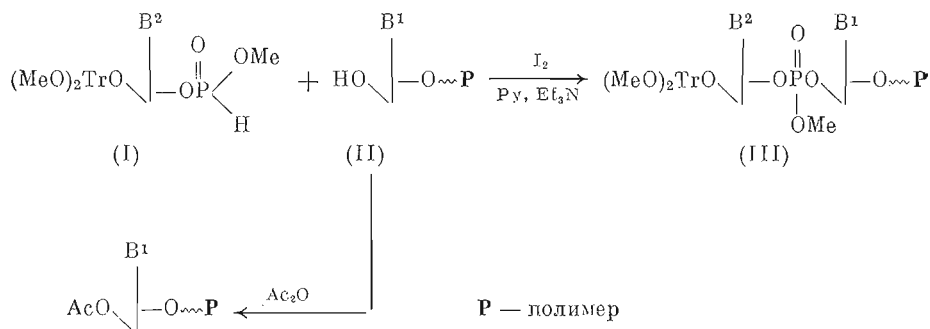
НОВЫЙ СПОСОБ СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Грязнов С. М., Потапов В. К.

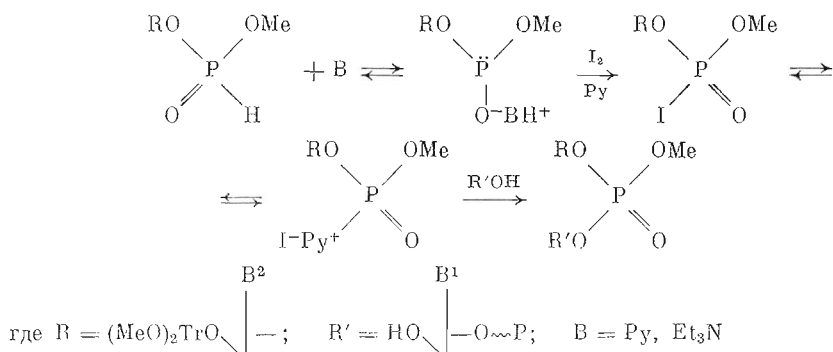
Всероссийский институт биотехнологии, Миньмедмикробиопром, Москва

В настоящее время наиболее распространенными методами твердофазного синтеза олигонуклеотидов * являются фосфитамидный [1] и Н-фосфонатный [2]. Однако продолжают попытки усовершенствовать существующие способы [3].

В данной работе предложен оригинальный подход, основанный на использовании принципа окислительного фосфорилирования для создания межнуклеотидной связи [4, 5] в рамках твердофазной триэфирной методологии.



В предлагаемой схеме каждый цикл наращивания нуклеотидной цепи на одно звено состоит из трех операций: 1) межнуклеотидной конденсации активируемого подом 3'-O-метилгидрофосфита нуклеозида (I) с 5'-гидроксильной группой находящегося на полимерном носителе нуклеозидного компонента, протекающей согласно вероятной схеме:



* Префикс «дезокси» здесь и далее для краткости опущен.

Карта-схема операций синтеза олигонуклеотидов

№	Операция	Реагент	Объем, мл	Время, с
1	Промывка	CH ₃ CN	1,0	10
2	Детритилирование	0,1 М CF ₃ COOH в CH ₂ Cl ₂	1,0	30
3	Промывка	CH ₃ CN	2,0	20
4	Межнуклеотидная конденсация	0,1 М (I) в CH ₃ CN и 0,2 М I ₂ в Py - Et ₃ N, 97 : 3	0,1	90
5	Промывка	CH ₃ CN	1,0	10
6	Кеипрование	1 М Ac ₂ O в CH ₃ CN - MeIm, 4 : 1	0,5	90
7	Промывка	CH ₃ CN	1,0	10

2) ацетилирования не вступивших в межнуклеотидную конденсацию 5'-гидроксильных групп нуклеозидного компонента (кеипрования);
3) детритилирования.

В предлагаемой схеме, так же как в фосфитамидном и Н-фосфонатном методах, нуклеотидные компоненты являются производными трехвалентного фосфора. Однако в указанных методах в результате межнуклеотидной конденсации образуется межнуклеотидный фосфитный узел, который затем окисляют, превращая в фосфатный, в каждом синтетическом цикле (фосфитный метод) или же по окончании синтеза (Н-фосфонатный метод). Предлагаемый нами подход отличается одновременным протеканием стадий образования межнуклеотидной связи и окисления.

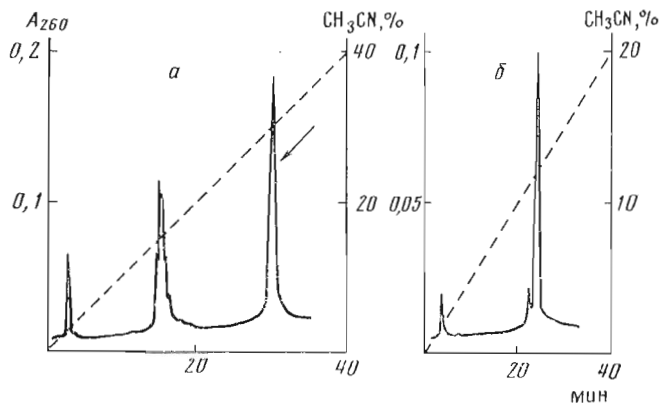
Следует также отметить, что 3'-О-метилфосфиты нуклеозидов (I) являются продуктом гидролиза 3'-О-(N,N'-диалкиламида)метилфосфитов нуклеозидов, используемых в фосфитамидном методе синтеза в 10—15-кратном избытке по отношению к нуклеозидному компоненту [1, 6]. Поэтому после проведения фосфитамидной конденсации избыток активированного тетразолом фосфитамида может быть гидролизован и полученный 3'-О-метилфосфит (I) использован для синтеза как природных олигонуклеотидов по предложенной схеме, что повышает общую экономичность олигонуклеотидного синтеза, так и модифицированных олигонуклеотидов [7]. Кроме того, соединения (I) могут быть получены согласно методике [7].

Возможности предложенного метода были продемонстрированы на примере синтеза эйкозатимидиловой кислоты (dT₂₀) на синтезаторе «Виктория-5М» согласно карте-схеме операций, представленной в таблице.

Общая продолжительность каждого синтетического цикла не превышает 5 мин. При проведении межнуклеотидной конденсации на полимерный носитель сначала подавали раствор иода, а затем раствор нуклеотидного компонента, после чего реакционную смесь выдерживали 1,5 мин без циркуляции. В качестве полимерного носителя использовали LCAA SPG-500 (20 мг: Риеге, США) с посадкой первого нуклеозида 20 мкмоль/г. Средний выход на стадию в расчете на удаляемую (MeO)₂Tr-группу составил 94%.

По завершении синтеза полимерный носитель обрабатывали смесью тиофенол — триэтиламин — дioxан, 1 : 1 : 2 об. (200 мкл, 40 мин), и промывали ацетонитрилом (4 × 1 мл). Затем нуклеотидный материал удаляли с полимерного носителя 25% водным аммиаком (30 мин, 50° С), раствор концентрировали в вакууме и целевой продукт выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок). Гомогенность выделенного олигонуклеотида (Tr)₁₉T была подтверждена электрофорезом в 20% ПААГ после 5'-³²P-мечения. Общий выход целевого продукта после выделения и очистки составил 11% в расчете на первое нуклеозидное звено, присоединенное к твердофазному носителю.

Аналогичным образом был получен гетерогенный гептадекануклеотид 5'GТААААСGACGGCCAGT3', общий выход которого после выделения электрофорезом в 20% ПААГ составил 9%. Этот олигонуклеотид в настоящее время успешно используется в качестве праймера при определении нуклеотидной последовательности по методу Сенгера.



Обращенно-фазовая ВЭЖХ: а — реакционной смеси, полученной при синтезе $(\text{MeO})_2\text{Tr}(\text{Tr})_{15}\text{T}$; пик целевого продукта отмечен стрелкой; носитель — Nucleosil C-18, 5 мкм, $4,6 \times 250$ мм; градиент ацетонитрила в 0,1 М ацетате триэтиламмония; б — $(\text{Tr})_{15}\text{T}$ после детритилирования продукта, выделенного согласно рисунку а; условия хроматографии те же

В настоящее время проводится дальнейшее изучение условий окислительного фосфорилирования и развитие предложенного метода для синтеза протяженных гетерогенных олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beaucage S. L., Caruthers M. H.* // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. № 20. P. 1859—1862.
2. *Froehler B. C., Matteuci M. D.* // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
3. *Fujii M., Nagai H., Sekine M., Hata T.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 13. P. 3832—3833.
4. *Кабачник М. М., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. № 4. С. 858—861.
5. *Грязнов С. М., Потапов В. К.* Заявка на изобретение, положительное решение № 4428349 от 08.04.88.
6. *Atkinson T., Smith M.* // *Oligonucleotide synthesis. A practical approach* / Ed. Gait M. L.: IRL Press, 1984. P. 35—81.
7. *Грязнов С. М., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* // Вестник Моск. Ун-та. Сер. 2, Химия. 1986. Т. 27. № 4. С. 421—424.

Поступило в редакцию
6.IV.1989

A NEW APPROACH TO THE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES USING OXIDATIVE PHOSPHORYLATION METHOD

GRYAZNOV S. M., POTAPOV V. K.

All-Union Institute of Biotechnology, Moscow

A new efficient method of the synthesis of oligodeoxyribonucleotides, based on the iodine activation of 3'-O-methylphosphitenucleosides in presence of bases, has been developed.