



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.057

© 1990 г.

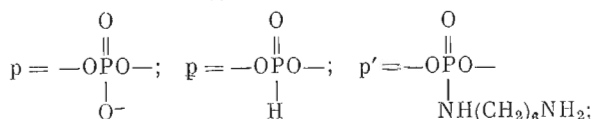
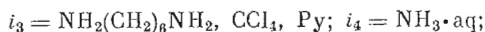
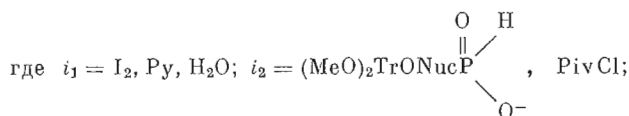
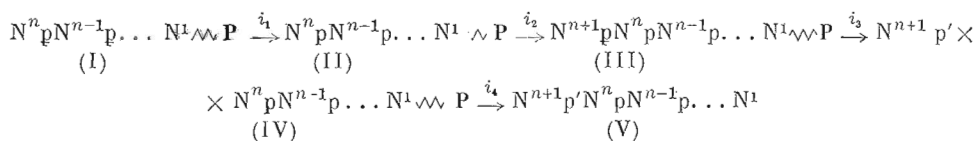
С. М. Грязнов, В. Ю. Потанов

НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ПРИРОДНЫХ И Р-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕСТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ

ВНИИ биотехнологии, Москва

Широкое распространение методов нерадиоактивного зондирования, секвенирования, а также возросший интерес к агентам для адресованной модификации нуклеиновых кислот привели к развитию новых подходов к получению олигонуклеотидов, содержащих алифатические аминокислоты [1—4].

В настоящей работе предлагается новый способ синтеза олигонуклеотидов, содержащих алифатические аминокислоты, присоединенные к межнуклеотидным фосфатным группам, с использованием Н-фосфонатного метода синтеза [5] и реакции окислительного фосфорилирования аминов Атертона — Тодда [6]. Получение названных соединений осуществляли согласно следующей схеме:



N — защищенные по основанию (I)—(V) или с удаленной защитной группой нуклеозиды; P_w — полимер с якорной группой.

Наращивание олигонуклеотидной цепи осуществляли Н-фосфонатным методом на синтезаторе «Beckman System 1 Plus» (таблица). После проведения заданного количества синтетических циклов олигонуклеотид, содержащий межнуклеотидные Н-фосфонатные группы (I), окисляли, затем олигонуклеотид с фосфодизфирными группами (II) удлиняли наращиванием еще одного или нескольких звеньев Н-фосфонатным методом

Принятые сокращения: префикс «d» (дезокс) в обозначениях олигонуклеотидов везде опущен; Piv — пивалоил, Py — пиридин.

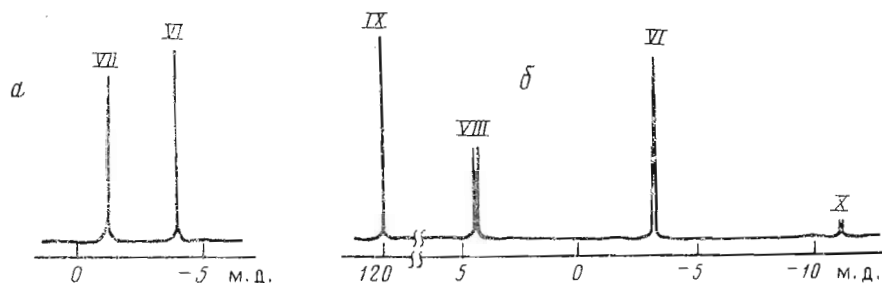


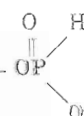
Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР соединений (VI) и (VII) без резонанса с протонами: *a* — до добавления PivCl ; растворитель — $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-d_5$, δ , м. д.: (VI) — 4,02, (VII) — 1,34, $^1J_{\text{P,H}}$ 705,6 Гц; *б* — через 30 мин после добавления PivCl ; растворитель — $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-d_5$ — CH_2CN , 10 : 1; δ , м. д.: (VIII) +4,28, +4,42, $^1J_{\text{P,H}}$ 703,7 Гц; (IX) +120,76, $^3J_{\text{P,C}\alpha}$ 9,0 Гц; (X) — 11,27, — 11,13. Рабочая частота 160 МГц

и амнировали вновь образованные межнуклеотидные фосфитные группы гексаметилендиамином по реакции Атертона — Тодда.

Согласно нашим теоретическим представлениям, межнуклеотидные фосфодиэфирные группы не должны оказывать сколько-нибудь заметного влияния на эффективность как межнуклеотидных конденсаций, осуществляемых H -фосфонатным методом, так и олигонуклеотидного синтеза в целом, и активированный хлористым пивалоилом нуклеотидный компонент реагирует только с 5'-гидроксильной группой растущей цепи в отличие от фосфодиэфирного метода синтеза, где активированный нуклеотидный компонент реагирует в первую очередь с самым сильным нуклеофилом в среде — межнуклеотидной фосфатной группой [7].

Эти предположения были подтверждены, во-первых, на модельной системе с использованием ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. Для этого в ампулу для ЯМР-спектроскопии к раствору 5',3'- O - и N -защищенного дигитидилфосфата (VI) (1 экв.) и 5'- O - и N -защищенного цитидин-3'- H -фосфоната (VII) (1 экв.) в пиридине добавили раствор хлористого пивалоила (7 экв.) в ацетонитриле и записали спектр (рис. 1). Оказалось, что образовавшиеся в реакционной смеси из исходного H -фосфоната (VII) активные интермедиаты (VIII) и (IX) не фосфорилируют межнуклеотидную фосфатную группу (VI), которая остается интактной по отношению к (VIII) и (IX) по крайней мере в течение 30 мин. Следует отметить, что в реакционной смеси происходит частичное (примерно на 15%) ацилирование хлористым пивалоилом межнуклеотидной фосфатной группы с образованием смешанного ангидрида (X), что не сказывается на эффективности олигонуклеотидного синтеза. Исчерпывающее ацилирование фосфатной группы происходит при использовании большого избытка (30 экв.) хло-

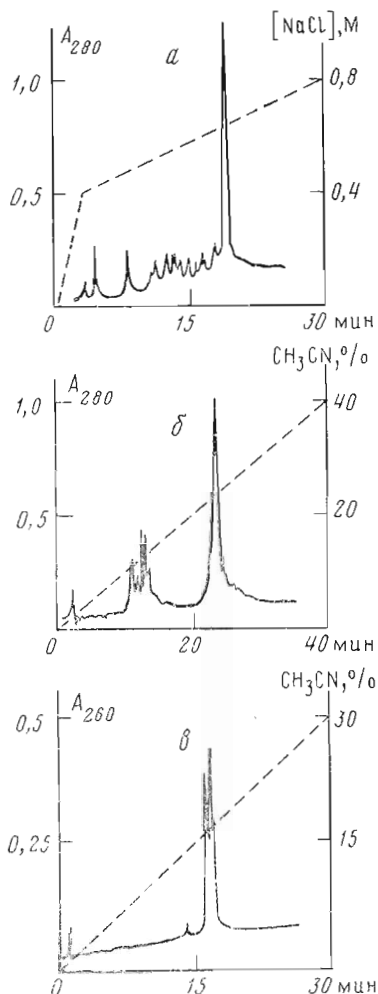
Карта-схема операций синтеза олигонуклеотидов

Операция	Реагент	Время, с
Промывка *	CH_2CN	10
Детритилирование	0,1 М CF_3COOH	90
Промывка	збс. CH_2CN	20
Конденсация **	0,3 мл 0,025 М $(\text{MeO})_2\text{TrONac}$ — 	60
Промывка *	в Ру и 1 мл 0,1 М $(\text{CH}_2)_4\text{CCOCl}$ в CH_2CN	10
Промывка *	збс. CH_2CN	10
	CH_2CN	10

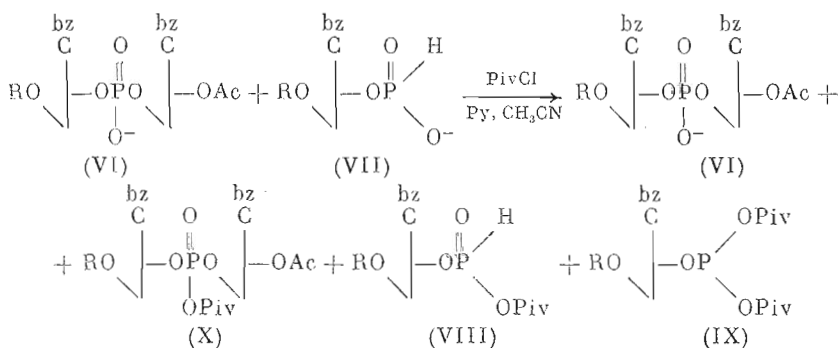
* Промывки осуществляются со скоростью 6 мл/мин.

** Конденсации проводятся в потоке реактивов, подаваемых в реактор со скоростью 0,4 мл/мин без их предварительного смешивания.

Рис. 2. ВЭЖХ-анализ реакционных смесей, полученных при синтезе олигонуклеотидов Н-фосфонатным методом. *a* — ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе гептадекануклеотида 5'-ГТААААСГАСГСС-САГТ с промежуточным окислением после 10-го синтетического цикла; колонка Mono-Q5/5, рН 12 (0,01 М NaOH). Скорость элюции 0,5 мл/мин; *b* — обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе олигонуклеотида (XII) с (MeO)₂Tr-группой; колонка PRO RPC 5/10, рН 7,0 (0,1 М CH₃COONH₄). Скорость элюции 0,5 мл/мин; *в* — обращенно-фазовая ВЭЖХ олигонуклеотида (XII) после детритилирования и выделения согласно рис. 2б; колонка Nucleosil C18 (4,6 × 250 мм), рН 7,0 (0,05 М CH₃COOEt₃NH). Скорость элюции 1 мл/мин



ристого пивалола:



Во-вторых, был синтезирован гептадекануклеотид 5'-ГТААААСГА--СГГССАГТ-3' с промежуточным окислением после 10-го синтетического цикла. Оказалось, что промежуточное окисление не сказывается на эффективности олигонуклеотидного синтеза (рис. 2а) и все характеристики полученного таким образом олигонуклеотида не отличаются от таковых для олигонуклеотида, полученного стандартным Н-фосфонатным методом. Необходимо специально отметить, что в ходе олигонуклеотидного синтеза после промежуточного окисления не наблюдается увеличения количества последнюю удаляемой диметоксигригильной защитной группы, что еще раз свидетельствует об инертности межнуклеотидной фосфатной группы к активированным Н-фосфонатным интермедиатам.

Для введения алифатической алкиламиногруппы мы использовали реакцию Атертона — Тодда, где в качестве диалкилфосфита выступает межнуклеотидный Н-фосфонатный узел, а аминок компонентом — 1,6-диаминогексан. Эта реакция была изучена нами методами ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, ВЭЖХ и ТСХ. Оказалось, что образование межнуклеотидной диазифирамидной группы в стандартных условиях в диоксане [8], а также в пиридине происходит менее чем за 15 мин с выходом продукта 92—95%.

С использованием описанного выше подхода были синтезированы олигонуклеотиды (см. также рис. 2):



Олигонуклеотид (XIII) содержит пять аминогрупп в одной молекуле, что позволяет использовать его для получения полимеченых зондов (к олигонуклеотидам (XII) и (XIII) после выделения и очистки был присоединен биотин). Использование высокоэффективной обращенно-фазовой ВЭЖХ позволяет разделить R_p - и S_p -изомеры по межнуклеотидной фосфодиазифирамидной группе соединения (XII) как до, так и после их биотинилирования. Синтезированные таким образом биотинилированные олигонуклеотиды в настоящее время успешно используются для нерадиоактивного зондирования, о чем будет сообщено дополнительно.

Результаты позволяют сделать вывод о возможности получения олигонуклеотидов, содержащих алифатические аминогруппы, присоединенные к межнуклеотидным фосфатным группам, с использованием только Н-фосфонатного метода синтеза. Также показано, что межнуклеотидные фосфодиазифирные группы не влияют на эффективность олигонуклеотидного синтеза Н-фосфонатным методом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sproat B. S., Lamond A. I., Beijer B., Neuner P., Ryder U. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 9. P. 3373—3386.
2. LeBrun S., Duchange N., Namane A., Zakin M. M., Huynh-Dinh T., Igolen J. // Biochimie. 1989. V. 71. P. 319—324.
3. Kaiser R. J., MacKellar S. L., Vinayak R. S., Sanders J. Z., Soavedra R. A., Hod L. E. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 15. P. 6087—6102.
4. Lin S.-B., Blake K. R., Miller P. S., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 3. P. 1054—1061.
5. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
6. Atherton T. R., Openshaw H. T., Todd A. R. // J. Chem. Soc. 1945. № 2. P. 660—663.
7. Khorana H. G. // Bioorgan. Chem. 1978. V. 7. № 3. P. 351—393.
8. Froehler B. C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 46. P. 5575—5578.

Поступило в редакцию
30.III.1990

S. M. GRYAZNOV, V. K. ПОТАРОВ

NEW IN SYNTHESIS OF NATURAL AND MODIFIED OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY H-PHOSPHONATE METHOD

All-Union Institute of Biotechnology, 117246 Moscow

An efficient method for obtaining oligodeoxyribonucleotides with alkylamino groups joined to internucleotide phosphate groups has been developed. It is shown that internucleotide phosphodiester group does not affect the efficiency of oligonucleotide synthesis by H-phosphonate method.