



УДК 547.963.3:542.935

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ

XXV. НОВЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Юодка Б., Лансфорд В. Б., Летсингер Р. Л.

*Вильямсский государственный университет,
Северо-западный университет (США)*

Хлорангидрид феноксиуксусной кислоты использован для специфического блокирования 5'-гидроксильной группы в дезоксирибонуклеозидах. Для образования межнуклеотидной связи в олигонуклеотидах применен фосфитный метод. Из 5'-О-феноксиацетилтимидина и эфира дихлорфосфита получено активное промежуточное соединение, которое при взаимодействии с 3'-О-монометокситригилтиимидином давало полностью блокированный динуклеозидмонофосфат. После удаления одной из защитных групп проведено ступенчатое и блочное наращивание олигонуклеотидной цепи. Все защитные группы удалены восстановлением с помощью натрия в гексаметиламиниде фосфорной кислоты в присутствии нафталина.

Синтетические олигонуклеотиды находят самое широкое применение в разных молекулярно-биологических и генетических исследованиях. Достигнуты большие успехи в химическом [2—6] и ферментативном [2, 7, 8] их синтезе. Однако синтез олигонуклеотидов с определенной последовательностью мононуклеотидов остается трудоемкой и длительной работой. Классическая схема синтеза включает в себя четыре основные проблемы: защита не участвующих в реакции функциональных групп нуклеозида и нуклеотида; активация остатка фосфорной кислоты нуклеотида; удаление защитных групп; разделение реакционной смеси.

Защитные группы должны быть подобраны таким образом, чтобы после синтеза динуклеозидмонофосфата можно было специфически удалить лишь одну защитную группу и полученный олигонуклеотид использовать для дальнейшего наращивания олигонуклеотидной цепи. Ранее для защиты 5'-гидроксильной группы нуклеозидов были использованы тригильная [9, 10], моно- и диметокситригильная [2, 11, 12], ацетильная [9, 10], триметилацетильная [13], трифенилметоксиацетильная [14] и другие защитные группы. Недавно для блокирования некоторых рибонуклеозидов была применена феноксиацетильная группа [15].

Для активации остатка фосфорной кислоты нуклеотида чаще всего используют дициклогексилкарбодимид или хлорангидриды ароматических сульфокислот. Конденсация соответствующим образом блокированных нуклеозидов и нуклеотидов, а также выделение продуктов реакции — наиболее длительные стадии работы. Недавно для облегчения разделения реакционной смеси были предложены экстракционный [2] и триэфирный [16, 17] методы синтеза олигонуклеотидов. Однако первый из них не яв-

* Сообщение XXIV см. [1].

Полученные таким путем частично защищенные динуклеозидмонофосфаты со свободной 3'- или 5'-гидроксильной группой использовали для синтеза тринуклеозиддифосфатов и тетра-нуклеозидтрифосфатов. Из соединений (I) и (VI) фосфитным методом был синтезирован ди-(2,2,2-трихлорэтил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (VIII), а из соединений (I) и (VIII) получен три-(2,2,2-трихлорэтил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (IX). Аналогичным образом из 3'-О-монометокситритилтимидина и соединения (VII) был синтезирован ди-(*o*-хлорфенил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (X), а из соединений (V) и (VII) получен три-(*o*-хлорфенил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (XI). Выходы олигонуклеотидов (VIII) — (XI) составляют 60—80%. Таким образом, предлагаемый метод может быть использован как для постепенного наращивания олигонуклеотидной цепи, так и для блочного синтеза олигонуклеотидов.

Мы установили, что вместо *o*-хлорфенилдихлорфосфита может быть использован аналогичный эфир дихлорфосфата. В данном случае отпадает необходимость в окислении, но значительно увеличивается продолжительность каждой стадии (синтез защищенного динуклеозидмонофосфата занимает 20—24 ч), поэтому мы отдаем предпочтение фосфитному методу. Необходимо отметить, что выходы олигонуклеотидов зависят от характера эфира дихлорфосфористой кислоты, применяемого в реакции. Так, оказалось, что лучше использовать не *o*-хлорфениловый, а 2,2,2-трихлорэтиловый эфир.

Недавно для удаления монометокситритильной группы успешно был применен метод восстановления с помощью натрия в гексаметилфосфотриамиде в присутствии нафталина [19]. Оказалось, что этот метод может быть использован для удаления как феноксиацетильной, так и трихлорэтильной защитных групп [20]. Разделение олигонуклеотидов после удаления защитных групп проводили на колонке с DEAE-сефадексом. Выходы олигонуклеотидов достигали 70%. Структуру полученных соединений доказывали определением соотношения тимидина и тимидин-5'-фосфата после гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда.

Экспериментальная часть

В работе использовали тимидин (Sigma, США), дезоксицитидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин (Nutritional Biochemicals Corporation, США), хлорангидрид бензойной кислоты (Eastman, США), гексаметилтриамид фосфорной кислоты и монометокситритилхлорид (Aldrich, США), DEAE-сефадекс (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу (Biorad, США), фосфодиэстеразу змеиного яда (Calbiochem, США), аналитические пластинки для тонкослойной хроматографии (Kodak, США), препаративные пластинки с силикагелем для тонкослойной хроматографии (Quantum Industries, США). Соединения, полученные после удаления 5'-О-феноксиацетильной группы, сравнивали с контрольными образцами при помощи ТСХ на силикагеле (А — этилацетат, Б — тетрагидрофуран). В случае олигонуклеотидов хроматографию проводили в следующих системах растворителей: эфир — хлороформ — спирт, 20 : 20 : 1 (В); этилацетат — тетрагидрофуран, 2 : 1 (Г); тетрагидрофуран — дихлорэтан, 1 : 3 (Д). 3'-О-монометокситритилтимидин синтезировали по методу работы [21], *o*-хлорфенилдихлорфосфит — по [22], 2,2,2-трихлорэтилдихлорфосфит — по [23]. Структуру защищенных олигонуклеотидов подтверждали элементным анализом, а деблокированные олигонуклеотиды гидролизовали диэстеразой змеиного яда и определяли соотношение $dT : dpT$ [24].

1. 5'-О-Феноксиацетилтимидин (I). 5 г (20,6 ммоль) тимидина высушили упариванием с абс. пиридином (2 × 24 мл), растворили в 150 мл абс.

пиридина, охладили до 0°, прибавили 3,2 г (22,9 ммоль) хлорангидрида феноксиуксусной кислоты, перемешивали 30 мин при 0° и оставили на ночь при комнатной температуре. Раствор упарили, остаток последовательно упарили с 50 мл спирта, 50 мл смеси спирт — этилацетат (1 : 1) и 50 мл этилацетата, остаток растворили в 60 мл смеси этилацетат — спирт (5 : 1) и раствор последовательно промыли 100 мл 1 н. HCl, 50 мл насыщ. NaCl, 90 мл 2% NaHCO₃ и 5 мл насыщ. NaCl. Органический слой высушили Na₂SO₄, упарили и остаток перекристаллизовали из смеси хлороформ — бензол (2 : 1). Выход 4,4 г (56%). Т. пл. 135—136°.

Найдено, %: С 57,82; Н 5,09; N 7,31. C₁₈H₂₀N₂O₇. Вычислено, %: С 57,44; Н 5,32; N 7,44.

2. *5'-О-Феноксиацетил-N-бензоилдезоксаденозин (II)* получили из 2,13 г (6 ммоль) N-бензоилдезоксаденозина [11] и 1,15 г (7 ммоль) PhOCH₂COCl в условиях опыта 1. После осаждения гексаном из тетрагидрофурана выход 2 г (68%).

Найдено, %: С 60,69; Н 4,74; N 14,35. C₂₅H₂₃N₅O₆. Вычислено, %: С 61,34; Н 4,74; N 14,31.

5'-О-Феноксиацетил-N-бензоилдезоксцитидин (III) получили из 1,46 г (4,97 ммоль) N-бензоилдезоксцитидина [11] и 0,84 г (5,1 ммоль) PhOCH₂COCl в условиях опыта 1. После упаривания с этилацетатом остаток растворили в 60 мл хлороформа и промыли водой (2 × 30 мл). Во время второй промывки выпало в осадок 1,35 г (58%) феноксиацетилбензоилдезоксцитидина.

Найдено, %: С 61,31; Н 4,96; N 9,07. C₂₄H₂₃N₃O₇. Вычислено, %: С 61,94; Н 4,95; N 9,03.

5'-О-Феноксиацетил-N-бензоилдезоксигуанозин (IV) получили из 2,55 г (6,87 ммоль) N-бензоилдезоксигуанозина [25] и 1,3 г (7,63 ммоль) PhOCH₂COCl в условиях опыта 1. Остаток после упаривания этилацетата промыли горячим бензолом (5 × 50 мл) и высушили в вакууме. Выход 2 г (58%).

Найдено, %: С 58,9; Н 4,59; N 14,20. C₂₅H₂₃N₅O₇. Вычислено, %: С 59,40; Н 4,59; N 13,85.

Удаление феноксиацетильной группы. Раствор 5—10 мг феноксиацетилдезоксинуклеозида в 0,2 мл диоксана или диметилформамида и 0,2 мл 9 М аммиака выдерживали при комнатной температуре, анализируя реакционную смесь через 2, 5, 10, 20, 30 и 60 мин с помощью ТСХ в тетрагидрофуране. Аналогично анализировали раствор феноксиацетилнуклеозида в 0,4 мл смеси диоксан — 0,2 н. NaOH (1 : 1). Показано, что у всех феноксиацетилдезоксинуклеозидов феноксиацетильная группа полностью удаляется через 20 мин под действием аммиака и через 10 мин под действием NaOH.

Синтез о-хлорфенилового эфира тимидил-ил-(3' → 5')-3'-О-монометокси-триптимидина (V). Фосфитный метод. К раствору 37,3 мкл (0,24 ммоль) о-хлорфенилдихлорфосфита и 111 мкл (0,96 ммоль) 2,6-лутидина в 0,5 мл абс. тетрагидрофурана при —78° прибавили в течение 4 мин раствор 100 мг (0,27 ммоль) 5'-О-феноксиацетилтимидина в 0,5 мл абс. тетрагидрофурана. Продолжали перемешивать 10 мин, затем реакционную смесь нагрели до 20°, прибавили 55,4 мкл (0,48 ммоль) 2,6-лутидина и раствор 61 мг (0,24 ммоль) иода в 2 мл 65% водного тетрагидрофурана. После 4 мин перемешивания раствор упарили, остаток растворили в 2 мл хлороформа, промыли 2-мл 5% раствора NaHSO₃, водный слой дополнительно проэкстрагировали хлороформом. Хлороформные экстракты после высушивания упарили. Остаток растворили в 25 мл диоксана, прибавили 25 мл 9 н. водн. NH₃ и выдержали 20 мин при комнатной температуре. Раствор упарили, остаток растворили в 2 мл воды и проэкстрагировали смесью бутанол — хлороформ (2 мл) и хлороформом (2 × 2 мл). Вещество, содержащееся в объединенных экстрактах, выделили с помощью препаративной ТСХ в системе Д, элюируя смесью тетрагидрофуран — спирт (2 : 1).

После осаждения гексаном из тетрагидрофурана выход 80 мг (65%).

Найдено, %: С 59,61; Н 5,1; N 6,21; P 3,60. $C_{16}H_{46}Cl_1N_4O_{13}P$. Вычислено, %: С 59,47; Н 4,95; N 6,03; P 3,33.

Фосфатный метод. К раствору 50 мг (0,133 ммоль) 5'-О-феноксиацетилтимидина в 1 мл абс. тетрагидрофурана прибавили 37 мг (0,16 ммоль) *o*-хлорфенилдихлорфосфата и 45 мкл (0,39 ммоль) 2,6-лутидина и перемешивали при комнатной температуре. Через 10 ч к реакционной смеси прибавили 68,4 мг (0,133 ммоль) 3'-О-монометокситритилтимидина, 45 мкл (0,39 ммоль) 2,6-лутидина, перемешивали еще 14 ч и упарили. Остаток растворили в хлороформе, промыли 5% $NaHCO_3$ и водой, высушили и упарили. Продукт реакции выделяли как в случае фосфитного метода. Выход 35 мг (56%).

2,2,2-Трихлорэтиловый эфир тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина (VI) получили из 100 мг (0,266 ммоль) 5'-О-феноксиацетилтимидина, 35,5 мкл (0,239 ммоль) 2,2,2-трихлорэтилдихлорфосфита и 68,4 мг (0,133 ммоль) 3'-О-монометокситритилтимидина аналогично описанному выше. Выход 103 мг (82%).

Найдено, %: С 53,01; Н 4,48; N 5,91; P 3,51. $C_{42}H_{44}Cl_3N_4O_{13}P$. Вычислено, %: С 53,11; Н 4,63; N 5,89; P 3,26.

Ди-(2,2,2-трихлорэтил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (VIII) получили из 49,5 мг (0,132 ммоль) 5'-О-феноксиацетилтимидина, 17,5 мкл (0,118 ммоль) 2,2,2-трихлорэтилдихлорфосфита и 50 мг (0,053 ммоль) 2,2,2-трихлорэтилового эфира тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина. Выход 50,7 мг (69%).

Найдено, %: С 46,91; Н 4,23; N 6,12; P 4,61. $C_{54}H_{58}Cl_6N_6O_{20}P_2$. Вычислено, %: С 46,80; Н 4,22; N 6,06; P 4,47.

Три-(2,2,2-трихлорэтил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (IX) получен из 30,1 мг (0,08 ммоль) 5'-О-феноксиацетилтимидина, 11 мкл (0,072 ммоль) 2,2,2-трихлорэтилдихлорфосфита и 45 мг (0,032 ммоль) ди-(2,2,2-трихлорэтил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина. Выход 43,1 мг (75%).

Найдено, %: С 43,70; Н 4,2; N 4,97; P 5,33. $C_{66}H_{72}Cl_9H_8O_{27}P_3$. Вычислено, %: С 43,52; Н 3,98; N 5,15; P 5,10.

o-Хлорфениловый эфир 5'-О-феноксиацетилтимидилл-(3' → 5')-тимидина (VII). *o*-Хлорфениловый эфир 5'-О-феноксиацетилтимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина, полученный фосфитным методом (см. выше) из 100 мг 5'-О-феноксиацетилтимидина, растворили в 5 мл 80% уксусной кислоты, нагревали 10 мин при 100° и упарили. Остаток растворили в 1 мл абс. тетрагидрофурана и вещество выделяли, как в случае соединения (V). Выход 54 мг (52%).

Найдено, %: С 51,40; Н 4,37; N 7,12; P 4,07. $C_{34}H_{36}ClN_4O_{14}P$. Вычислено, %: С 51,58; Н 4,55; N 7,07; P 3,93.

Ди-(*o*-хлорфенил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (X) получили из 33 мг (0,04 ммоль) *o*-хлорфенилового эфира 5'-О-феноксиацетилтимидилл-(3' → 5')-тимидина, 22 мг (0,04 ммоль) 3'-О-монометокситритилтимидина, 5,7 мкл (0,036 ммоль) *o*-хлорфенилдихлорфосфита и 16,8 мкл (0,114 ммоль) 2,6-лутидина аналогично синтезу соединения (V). Выход 27 мг (50%).

Найдено, %: С 55,41; Н 4,71; N 5,98; P 4,93. $C_{62}H_{63}Cl_2N_6O_{20}P_2$. Вычислено, %: С 55,38; Н 4,68; N 6,25; P 4,61.

Три-(*o*-хлорфенил)-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидин (XI) получен из 33 мг (0,04 ммоль) *o*-хлорфенилового эфира 5'-О-феноксиацетилтимидилл-(3' → 5')-тимидина, 18,6 мг (0,02 ммоль) *o*-хлорфенилового эфира тимидилл-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина и 5,7 мкл (0,036 ммоль) *o*-хлорфенилдихлорфосфита аналогично синтезу соединения (X). Выход 16 мг (45%).

Найдено, %: С 53,41; Н 4,63; N 6,25; P 5,51. $C_{78}H_{79}Cl_3N_8O_{27}P_3$. Вычислено, %: С 53,25; Н 4,49; N 6,37; P 5,22.

Удаление защитных групп.

а) Раствор 15,8 мг (9 мкмоль) соединения (XI) в 5 мл 80% уксусной кислоты нагрели 10 мин при 100°, упарили, остаток растворили в 5 мл диоксана и прибавили 5 мл 0,2 М NaOH. Раствор выдержали 3 ч при комнатной температуре, нейтрализовали дауэксом-50 (H⁺) и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻) (1,0 × 30 см) в градиенте концентрации бикарбоната аммония (0,01—1 М, 0,6 л). Фракции, соответствующие единственному пику, объединили и лиофилизировали. Выход d(TrTrTrT) 6,3 мг (60%). После гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда [24] найдено соотношение dT : dpT 1 : 2,83.

б) 23 мг (1 ммоль) металлического натрия перемешали с 4 мл абс. гексаметила триамида фосфорной кислоты до образования темно-синего раствора. прибавили 150 мг (1,2 ммоль) нафталина, а затем (после появления темно-зеленого окрашивания) 2,5 мг (2,63 ммоль) 2,2,2-трихлорэтилового эфира тимидил-л-(3' → 5')-3'-О-монометокситритилтимидина в 0,1 мл абс. пиридина и перемешивали 5 мин при комнатной температуре. Остатки натрия разложили несколькими каплями воды, реакционную смесь разбавили водой до объема 50 мл, нейтрализовали HCl до pH 8 и проэкстрагировали хлороформом (4 × 50 мл). Водный слой довели до pH 8,5, перенесли на колонку (1 × 19 см) с DEAE-сефадексом А-25 и хроматографировали в градиенте концентрации бикарбоната аммония (0,01—0,25 М, 200 мл), собирая фракция по 7,5 мл/18 мин. Из фракций 29 и 30 после лиофилизации получили 41,6 ОЕ₂₅₄ (76%) d(TrT). После фосфодиэстеразного гидролиза найдено dT : dpT, 1 : 0,91.

Аналогично были получены d(TrTrT) и d(TrTrTrT) с выходом соответственно 65 и 71%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юodka Б. А., Саснаускене С. И., Мешкенайте В. И., Кадзюускене К. В. (1976) Ж. общ. химии, 46, 586—590.
2. Khorana H. G., Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Klepepe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., van de Sande J. H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T. (1972) J. Mol. Biol., 72, 209—492.
3. Narang S. A., Itakura K., Bake C. P., Katagiri N. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 7074—7078.
4. Schott H., Kossel H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3778—3785.
5. Poonian M. S., Nowoswiat E. F., Tobias L., Nusbaum A. L. (1973) Bioorg. Chem., 2, 322—336.
6. Смирнов В. Д., Каграманов В. Н., Козлов И. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Молекулярн. биология, 6, 292—299.
7. Gillam S., Waterman K., Doel M., Smith M. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 1649—1664.
8. Venetianer P., Leder P. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3892—3895.
9. Levene P. A., Tipson R. S. (1935) J. Biol. Chem., 109, 623—628.
10. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6222.
11. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821—3827.
12. Smith A., Rammner D. H., Goldberg I. H., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 430—440.
13. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 4329—4341.
14. Werstiuk E. S., Neilson T. (1973) Can. J. Chem., 51, 1889—1892.
15. Reese C. B., Stewart J. C. M. (1968) Tetrahedron Letters, 4273—4275.
16. Letsinger R. L., Mahadevan V. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 3526—3527.
17. Catlin J. C., Cramer F. (1973) J. Org. Chem., 38, 245—250.
18. Letsinger R. L., Finnan J. L., Heavner G. A., Lunsford W. B. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 3278—3279.
19. Greene G. L., Letsinger R. L. (1975) Tetrahedron Letters, 2081—2084.
20. Letsinger R. L., Lunsford W. B. (in press).
21. Ogilvie K. K., Letsinger R. L. (1967) J. Org. Chem., 32, 2365—2366.
22. Tolkmith H. (1958) J. Org. Chem., 23, 1682—1684.
23. Gerrard W., Green W. J., Phillips R. J. (1934) J. Chem. Soc., 1148—1150.

24. Ralph R. K., Connors W. J., Schaller H., Khorana H. G. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1983—1988.
25. Weber H., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 219—249.

Поступила в редакцию
9.I.1976

После переработки
20.IV.1976

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE-PEPTIDES.
XXV. A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES

YUODKA B., LUNSFORD W. B., LETSINGER R. L.

State University, Vilnius; Northwestern University (USA)

Phenoxyacetyl chloride has been used for the protection of 5'-hydroxyl groups of deoxythymidine, N-benzoyldeoxycytidine, N-benzoyldeoxyadenosine and N-benzoyldeoxyguanosine. The optimal conditions are found for the specific removal of phenoxyacetyl group. The oligothymidylates have been synthesized by a new phosphite method. Using 5'-O-phenoxyacetyldeoxythymidine and dichlorophosphite ester, an active intermediate has been obtained which subsequently was reacted with 3'-O-monomethoxytritylthymidine, thus affording completely protected dinucleoside monophosphate. After removal one of the protecting group, stepwise and block condensations were employed for the oligonucleotide synthesis. Eventually all the protecting groups were cleaved in phosphoric hexamethyltriamide by reduction with sodium in the presence of naphthalene. The procedure resulted in d(TpT), d(TpTpT), and d(TpTpTpT) formation in 60-80% yield.
