



УДК 547.963.32 : 542.953.2 + 543.422.23

**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ДИНУКЛЕОТИДОВ
С ЗАЩИЩЕННЫМ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМ ФОСФАТОМ
В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОМ СИНТЕЗЕ*****Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Шубина Т. Н.***Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Методом ^{31}P -ЯМР исследована активация дидезоксинуклеотидов с защищенным межнуклеотидным фосфатом в присутствии триизопрпилбензолсульфохлорида. На примере $\text{pTr}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ показано, что конечным продуктом превращения является активное фосфорилирующее производное с химическим сдвигом δ 5,0 м. д., аналогичное мономерному активному производному монодезоксинуклеотидов. Установлено, что это производное обладает высокой реакционной способностью в олигонуклеотидном синтезе. Превращение нуклеозидного компонента — дианилида pT в случае синтеза $(\text{PhNH})_2\text{pTrTrT}$ близко к 100%, а превращение тринуклеотида $(\text{PhNH})_2\text{pTrTrT}$ при синтезе пентануклеотида $(\text{PhNH})_2\text{pTrTrTrT}$ достигает 65%. Обсуждены преимущества использования в качестве нуклеотидной компоненты динуклеотидных блоков с защищенным межнуклеотидным фосфатом.

Обычно при получении длинных олигонуклеотидов для наращивания олигонуклеотидной цепи в качестве нуклеотидной компоненты используют динуклеотидные блоки. Как показано в работе [1], при активации дидезоксинуклеотидов в присутствии арилсульфохлоридов наиболее активное фосфорилирующее производное образуется при достаточно больших избытках конденсирующего агента и содержит в спектре ^{31}P -ЯМР помимо синглета с δ 5 м. д. сигнал тетразамещенной цирофосфатной группировки с химическим сдвигом δ 14,2 м. д. Тетразамещенные цирофосфаты являются фосфорилирующими агентами [2, 3] и поэтому могут служить источником побочных реакций по межнуклеотидному фосфату, приводящих к загрязнению целевого продукта. Защита межнуклеотидного фосфата в динуклеотидном блоке должна сводить реакцию арилсульфохлоридов с дидезоксинуклеотидами только к активации концевой 5'-фосфата, подробно изученной ранее на примере монодезоксинуклеотидов [4, 5]. Наращивание олигонуклеотидной цепи такими блоками с последующим деблокированием межнуклеотидного фосфата после каждой конденсации должно приводить к образованию олигонуклеотида, содержащего только фосфодиэфирные связи и легко выделяемого ионообменной хроматографией. Такого типа производное $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{CNEt})\text{Tr}$ было описано в работе [6], где его использовали в качестве нуклеотидной компоненты в синтезе тетра-нуклеотида при соотношении $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{CNEt})\text{Tr} - \text{Tr}(\text{CNEt})\text{Tr}(\text{PhNH})_2$,

* В работе использованы сокращения в соответствии с рекомендациями IUPAC — IUB (1971) Mol. Biol., 55, 299; приставка d- в символах для тимидина и его производных везде опущена.

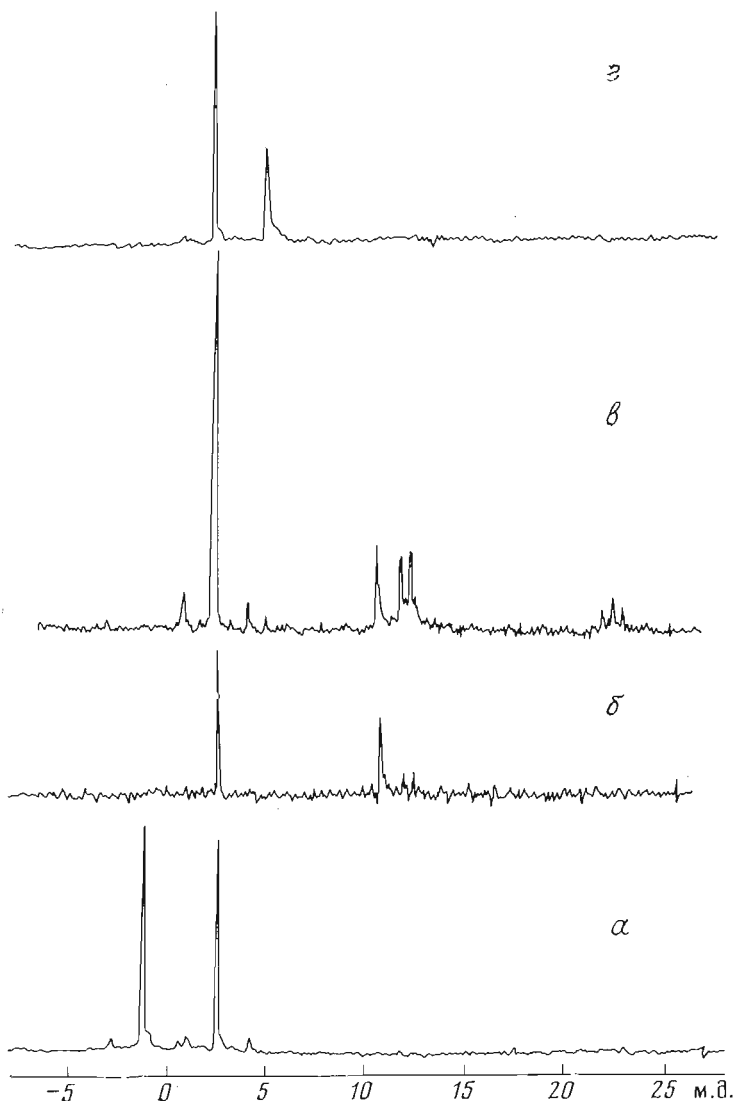
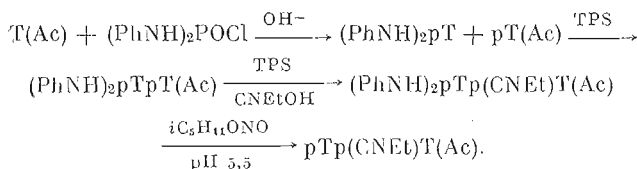


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР $p\text{Tp}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ в абс. пиридине (а) и при добавлении к раствору триизопропилбензолсульфохлорида: 2 экв. (б), 2 экв. (с), 4 экв. (д). Спектры записаны через 15, 40 мин и 24 ч соответственно

равном 1,5 : 1. Тетрануклеотид был выделен адсорбционной хроматографией на силикагеле с выходом 49%.

Настоящая работа посвящена изучению методом ^{31}P -ЯМР активации дидезокси-нуклеотидов, защищенных по межнуклеотидному фосфату дианоэтильным остатком, в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида (TPS), а также возможности использования таких блоков в олигонуклеотидном синтезе.

Производные 5'-динуклеотидов с защищенным межнуклеотидным фосфатом были получены по схеме



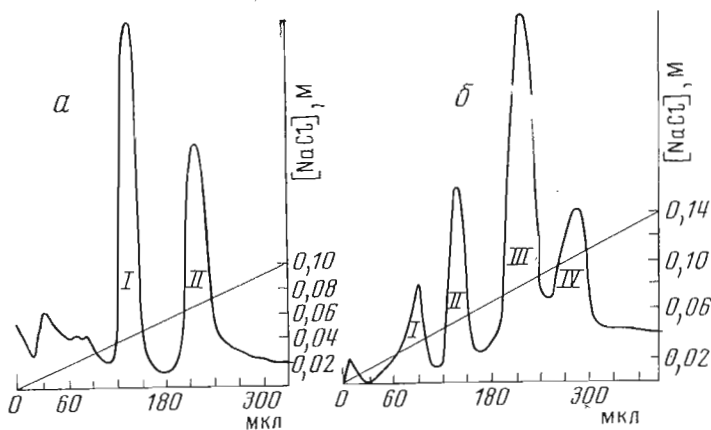


Рис. 2. Анализ микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона — Тенера (рН 7,5) реакционных смесей (до снятия анилидной защиты): *a* — при синтезе тринуклеотида рТрТрТ (I — (PhNH)₂рТрТрТ, II — рТрТ); *б* — при синтезе пентауклеотида рТрТрТрТрТ (I — триизопропилбензолсульфокислота, II — (PhNH)₂рТрТрТ, III — рТрТ, IV — (PhNH)₂рТрТрТрТрТ).

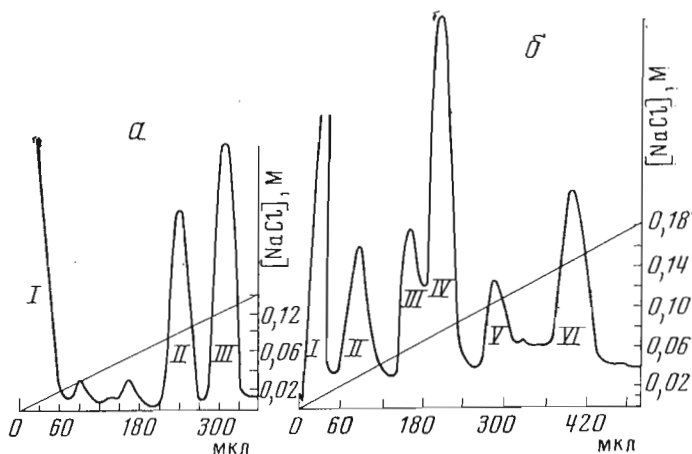
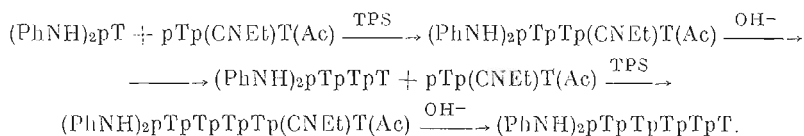


Рис. 3. Анализ микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона — Тенера (рН 7,5) реакционных смесей (после снятия анилидной защиты): *a* — при синтезе тринуклеотида рТрТрТ (I — ацетат пиридиния, II — рТрТ, III — рТрТрТ); *б* — при синтезе пентауклеотида рТрТрТрТрТ (I — ацетат пиридиния, II — триизопропилбензолсульфокислота, III — неидентифицированный продукт, IV — рТрТ, V — рТрТрТ, VI — рТрТрТрТрТ).

На примере рТр(CNEt)Г(Ас) было показано, что активация таких производных в присутствии TPS протекает аналогично описанной ранее для монодезоксинуклеотидов. В спектре ³¹P-ЯМР (рис. 1) последовательно регистрируются сигналы: 5',5'-симметричного пирофосфата (δ 10,5 м.д.), тризамещенного триполифосфата (дублет с центром при δ 11,9 и триплет с центром при δ 22 м.д.) и, наконец, метафосфата (δ 5,04 м.д.). Первые две стадии активации протекают относительно быстро в присутствии 2 экв. TPS. Однако полное превращение триполифосфата в метафосфат достигается только при добавлении еще 2 экв. TPS, что, возможно, объясняется присутствием посторонних нуклеофилов (например, ацетат-иона) в реакционной смеси и соответственно расходом арилсульфохлорида на побочные реакции. В связи с этим необходимо подчеркнуть

важность контроля за стадией активации нуклеотидной компоненты в ходе олигонуклеотидного синтеза с целью получения высоких выходов синтезируемых продуктов.

Использование линуклеотидного блока $p\text{Tr}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ для наращивания олигонуклеотидной цепи было осуществлено по схеме



Для блокирования концевого 5'-фосфата была использована дианилидная защитная группа [6], исключительно стабильная в условиях олигонуклеотидного синтеза и хроматографического выделения целевых продуктов и легко удаляемая изоамилнитритом [7]. Нуклеотидную компоненту $p\text{Tr}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ брали в избытке, равном $n + 2$ (n — число фосфодиэфирных остатков в нуклеозидной компоненте), в соответствии с данными, полученными в работе [8]. TPS использовали в 4-кратном избытке по отношению к нуклеотидной компоненте. Содержание синтезированного олигонуклеотида в реакционной смеси, по данным микроколониной хроматографии в системе Томлинсона — Тенера [9] (рис. 2, 3), составляло для $(\text{PhNH})_2 \cdot p\text{TrTrT}$ 100% и $(\text{PhNH})_2p\text{TrTrTrT}$ — 65%. В реакционных смесях не было обнаружено 5',5'-симметричных пирофосфатов, наиболее часто образующихся побочных продуктов реакции. Выделенные олигонуклеотиды хроматографически гомогенны (см. «Экспериментальную часть»), УФ-спектры приведены на рис. 4.

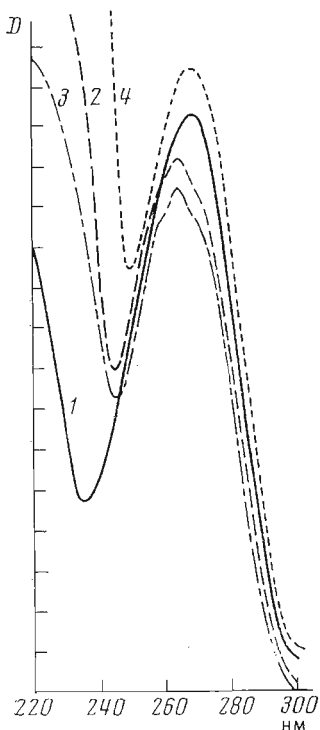


Рис. 4. УФ-спектры поглощения $p\text{T}$ (1), $(\text{PhNH})_2p\text{TrT}(\text{Ac})$ (2), $(\text{PhNH})_2p\text{TrTrT}(\text{Ac})$ (3), $(\text{PhNH})_2p\text{T}$ (4). Спектры 1—3 сняты в воде (рН 6,5), спектр 4 — в спирте

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что 5'-дезоксидинуклеотиды, защищенные по межнуклеотидному фосфату, могут успешно использоваться в олигонуклеотидном синтезе в качестве нуклеотидной компоненты. Накопленный к настоящему времени обширный материал по механизму синтеза межнуклеотидной связи в совокупности с применением таких блоков для наращивания олигонуклеотидной цепи делает возможным проведение олигонуклеотидного синтеза в наиболее оптимальном режиме.

Экспериментальная часть

В работе использовали тимидин-5'-фосфат и 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид производства Опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР, тимидин фирмы Koch-Light (Англия). Содержание влаги в пиридине менее 0,02%, в дианэтанол — 0,03%. Дианилид хлорангидрида фосфорной кислоты получали по методике работы [10].

ТСХ проводили на пластинках с силикагелем марки DC-Alufolien-Kieselgel 60F254 (Merck, ФРГ) в системах ацетонитрил — вода, 4 : 1 (А), хлороформ — этанол, 9 : 1 (Б).

Нисходящую хроматографию на бумаге FN1 (ГДР) проводили в системе этанол — 4 М ацетат аммония, 7 : 3, рН 7,5 (В).

Синтезированные соединения анализировали методом микроколоночной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 0,01 М трис-HCl-буфере, содержащем 7 М мочевины (рН 7,5). Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразователем на ЭВМ В-NC12 фирмы Bruker-Physic-AG на частоте 36,43 Гц. Химические сдвиги приводили относительно H_3PO_4 как внешнего стандарта. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5—2 мл. УФ-спектры записывали на спектрофотометре Bruker DB-DG.

Тимидин-5'-дианилидофосфат. 852 мг (3 ммоль) 3'-ацетилтимидина растворили в абс. пиридине (10 мл) и добавили 831 мг (3,3 ммоль) дианилида хлорангидрида фосфорной кислоты. Через 2 сут к реакционной смеси добавили 10 мл 5% водного раствора уксуснокислого калия и оставили на 30 мин. Водно-пиридиновый раствор упарили в вакууме, азеотропной отгонкой с бензолом удалили следы пиридина. Остаток суспендировали в 40 мл воды и экстрагировали хлороформом (8 мл \times 5). Хлороформный экстракт упарили, остаток высушили абс. пиридином, пиридин удалили азеотропной отгонкой с абс. бензолом, продукт растворили в ацетоне и осадили петролевым эфиром.

Выход 1270 мг (2,7 ммоль), 90%. Найдено, %: N 11,84; P 6,62. Вычислено, %: N 11,82; P 6,56. R_f 0,75 (А), 0,43 (Б), 0,80 (В). УФ-спектр $(\text{PhNH})_2\text{pT}$ приведен на рис. 4. В спектре ^{31}P -ЯМР (пиридин) регистрируется один сигнал при $-2,6$ м. д.

5'-Дианилидофосфотимидилл-(3' \rightarrow 5')-тимидин-3'-ацетат. 886 мг (2 ммоль) $\text{pT}(\text{Ac})$ растворили в 8 мл абс. пиридина, добавили 1520 мг (5 ммоль) TPS и через 3 ч 471 мг (1 ммоль) $(\text{PhNH})_2\text{pT}$, выдержали 7 ч, разбавили равным объемом воды и оставили на ночь. Реакционную смесь упарили, удалили азеотропной отгонкой с бензолом следы пиридина, остаток суспендировали в 50 мл воды и экстрагировали хлороформом (10 мл \times 6). Затем водный слой экстрагировали смесью хлористый метилен — *n*-бутанол, 7 : 3 (10 мл \times 8). Органический слой упарили, высушили отгонкой с абс. пиридином, остаток растворили в пиридине и осадили эфиром. Выход 840 мг (92%).

Гомогенность продукта подтверждали микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона — Тенера, хроматографией в системах А (R_f 0,72), В (R_f 0,85), а также спектром ^{31}P -ЯМР.

УФ-спектр $(\text{PhNH})_2\text{pTpTAc}$ приведен на рис. 4.

P²- β -цианэтиловый эфир 5'-фосфотимидилл-(3' \rightarrow 5')-тимидин-3'-ацетата $\text{pTp}(\text{CE})\text{T}(\text{Ac})$. К 110 мг (0,12 ммоль) $(\text{PhNH})_2\text{pTpT}(\text{Ac})$ в 1 мл абс. пиридина добавили 73 мг (0,24 ммоль) TPS и через 1 ч 0,84 мл (12 ммоль) этиленциангидрина. Через сутки реакционную смесь упарили, удалили следы пиридина отгонкой с бензолом, к остатку добавили 10 мл воды и 5 мл хлороформа, смесь интенсивно встряхнули. Хлороформный слой отделили, а водный слой промыли хлороформом (3 мл \times 5). Хлороформные экстракты объединили, упарили, высушили азеотропной отгонкой с абс. пиридином, растворили в смеси пиридин — уксусная кислота, 1 : 1 (3 мл) и добавили 0,5 мл изоамилнитрита. Через 16 ч смесь упарили, удалили следы пиридина, остаток растворили в воде и экстрагировали хлороформом. Водный слой сконцентрировали и продукт выделили с помощью ТСХ на силикагеле. Выход 50 мг (0,057 ммоль), 47%.

Вещество гомогенно по данным микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона — Тенера, а также по данным хроматографии в системах А (R_f 0,33) и В (R_f 0,63). После удаления щелочелавильных защит значение R_f полученного соединения в системах А и В совпадало с подвижностью контрольного образца pTpT .

5'-Дианилидофосфотимидилл-(3' \rightarrow 5')-тимидин-(3' \rightarrow 5')-тимидин, $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpT}$. 90 мг (0,1 ммоль) $\text{pTp}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ растворили в 1 мл

абс. пиридина, добавили 122 мг (0,4 ммоль) TPS, и через 24 ч 24 мг (0,05 ммоль) $(\text{PhNH})_2\text{pT}$, выдержали 8 ч. К реакционной смеси добавили равный объем воды и оставили на 16 ч. Водно-пиридиновый раствор упарили, удалили пиридин азеотропной отгонкой с бензолом, остаток растворили в воде и экстрагировали хлороформом (3 мл \times 3). Водный слой упарили, растворили в конц. аммиаке и оставили на 5 ч при 40°. Профиль реакционной смеси после снятия щелочелабильных защитных групп представлен на рис. 2, а. Профиль аликвоты реакционной смеси после последующего удаления дианилидной защитной группы представлен на рис. 3, а. Анализ реакционной смеси методом ТСХ в системах А и Б показал отсутствие нуклеозидной компоненты. По данным микроколоночной хроматографии (соотношение площадей пиков, соответствующих ди- и тринуклеотиду), степень превращения нуклеозидной компоненты в тринуклеотид составляет 100%. Продукт $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpT}$ был выделен с помощью ТСХ на силикагеле. Гомогенность подтверждена хроматографией в системах А (R_f 0,49) и В (R_f 0,70), а также микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона — Генера. После удаления всех защитных групп значение R_f продукта в системе В совпадало с подвижностью контрольного образца pTpTpT .

5'-Дианилидофосфотимидилил-(3' \rightarrow 5')-тимидин-(3' \rightarrow 5')-тимидин-(3' \rightarrow 5')-тимидин $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpTpTpT}$. К 80 мг (0,088 ммоль) $\text{pTp}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$ в 1 мл абс. пиридина добавили 105 мг (0,35 ммоль) TPS и через 22 ч 26 мг (0,022 ммоль) $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpT}$. Через 7 ч реакционную смесь упарили, к остатку добавили 5 мл конц. аммиака и оставили на 5 ч при 40°. Раствор упарили, удалили азеотропной отгонкой с бензолом следы пиридина. Реакционную смесь анализировали методом микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона — Генера. Профили реакционных смесей после удаления щелочелабильных защитных групп и последующего удаления дианилидной защитной группы приведены на рис. 2, б и 3, б соответственно. Содержание пентануклеотида в реакционной смеси, определенное по соотношению площадей пиков, соответствующих пента- и тринуклеотиду, составило 65%. Пик, соответствующий пентануклеотиду (0,15 М), собирали. Продукт был подвергнут дефосфорилированию при помощи фосфомоноэстеразы из *E. coli* и последующему гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда*. Соотношение Т—рТ равно 1 : 3,9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадашкесва А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. (1975) Докл. АН СССР, 222, 97—100.
2. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, 126—131.
3. Mason H. S., Tcdd A. R. (1951) J. Chem. Soc., 2267.
4. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С. (1973) Докл. АН СССР, 212, 630—637.
5. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Resvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) Tetrahedron, 30, 3073—3079.
6. Zielinski W. S., Smrt J. (1974) Collect. Czechosl. Chem. Commun, 39, 2483—2490.
7. Ohtsuka E., Murao K., Ubasawa M., Ikehara M. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3441—3446.
8. Кнорре Д. Г., Левина А. С., Шубина Т. Н. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, 118—128.
9. Тенер Г. (1970) в кн. Методы исследования нуклеиновых кислот, с. 85, «Мир», М.
10. Heuben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie (1964) Bd 12/2, p. 445, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Поступила в редакцию
26.IV.1976

* Препараты любезно предоставлены Г. Т. Бабкиной.

STUDY ON THE REACTIVITY OF DINUCLEOTIDES BEARING PROTECTED INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATE GROUP IN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS

KNORRE D. G., MISHENINA G. F., SHUBINA T. N.

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

Activation of dideoxynucleotides, which have protected internucleotide phosphate group, in the presence of triisopropylbenzenesulphonyl chloride was investigated by ^{31}P -NMR method. As exemplified with $\text{pTp}(\text{CNEt})\text{T}(\text{Ac})$, the final product of the conversion appeared to be an active derivative characterized by δ 5,0 ppm and analogous to a monomeric active derivative from deoxymononucleotide. This derivative exhibited high reactivity in phosphorylation reactions. The degree of the conversion of the nucleoside component, thymidine 5'-phosphorodiamidate, was about 100% in the synthesis of trinucleotide $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpT}$. This trinucleotide was converted into $(\text{PhNH})_2\text{pTpTpTpTpT}$ in 65% yield. The advantages of utilizing such dinucleotide blocks with protected internucleotide phosphate group as nucleotide components are discussed.
