



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.6

© 1994 В. А. Ефимов, А. Л. Калинкина,
О. Г. Чахмахчева

ДИПЕНТАФТОРФЕНИЛКАРБОНАТ В СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: олигонуклеотидный синтез, Н-фосфонатный метод, конденсирующий реагент.

В последнее время в практике олигонуклеотидного синтеза широкое распространение получил твердофазный Н-фосфонатный метод [1, 2], основными преимуществами которого являются высокая скорость, простота получения мономеров и их относительная стабильность, а также отсутствие необходимости блокирования межнуклеотидных фосфатных групп. В качестве конденсирующих реагентов в этом методе обычно используются хлорангидриды карбоновых кислот, в частности пивалоилхлорид [2] и адамантоилхлорид [3]. С применением этой методологии были получены достаточно протяженные фрагменты ДНК и РНК, однако выходы целевых соединений, а следовательно, и практическая ценность этого метода (в особенности для получения препаративных количеств олигонуклеотидов) несколько снижаются из-за побочных процессов, протекающих во время межнуклеотидной конденсации. К таким процессам следует прежде всего отнести модификацию гетероциклических оснований нуклеотидов, ацилирование 5'-гидроксильной группы нуклеозидного компонента реакции и так называемую преактивацию нуклеотидного компонента с образованием низкорекционноспособных промежуточных соединений [4]. Ранее нами была предложена модификация Н-фосфонатного метода синтеза, включающая использование в качестве растворителя в реакции межнуклеотидной конденсации смеси ацетонитрила и хинолина [5], что позволило свести к минимуму побочные процессы, связанные с преактивацией нуклеотидного компонента и модификацией гетероциклических оснований.

В продолжение исследований по усовершенствованию Н-фосфонатного метода синтеза нами были предприняты поиски новых конденсирующих реагентов. Мы нашли, что эффективным реагентом для создания Н-фосфонатной межнуклеотидной связи является дипентафторфенилкарбонат (PFPC). Это соединение, предложенное ранее в пептидном синтезе как удобный реагент для получения пентафторфениловых эфиров аминокислот и их производных [6], получило там достаточно широкое распространение. PFPC представляет собой негигроскопичное белое кристаллическое вещество, растворимое в большинстве органических растворителей и способное длительное время храниться при комнатной температуре.

Изучение скорости межнуклеотидной конденсации в растворе в присутствии PFPC (6 экв.) проводилось нами на примере взаимодействия 0,05 М раствора

Последовательность операций одного цикла наращивания
олигонуклеотидной цепи (0,2- и 1-мкмольный уровень)

Номер операции	Операция *	Время, мин
1	Детритилирование (2% трихлоруксусная кислота в дихлорметане)	2
2	Промывка ацетонитрилом	1,5
3	Промывка смесью ацетонитрил — пиридин (2 : 1)	1
4	Конденсация **	2,5
5	Промывка смесью ацетонитрил — пиридин (2 : 1)	1
6	Кэпирование ***	1
7	Промывка смесью ацетонитрил — пиридин (2 : 1)	0,5
8	Промывка ацетонитрилом	0,5
9	Промывка дихлорметаном	1

* Скорость подачи растворителей 1 мл/мин.

** 125 мкл 0,05 М раствора Н-фосфоната в смеси ацетонитрил — пиридин (1 : 1) и 125 мл 0,15 М раствора PFPC в ацетонитриле подаются одновременно в реакционный сосуд с носителем и реакционная смесь выдерживается 150 с.

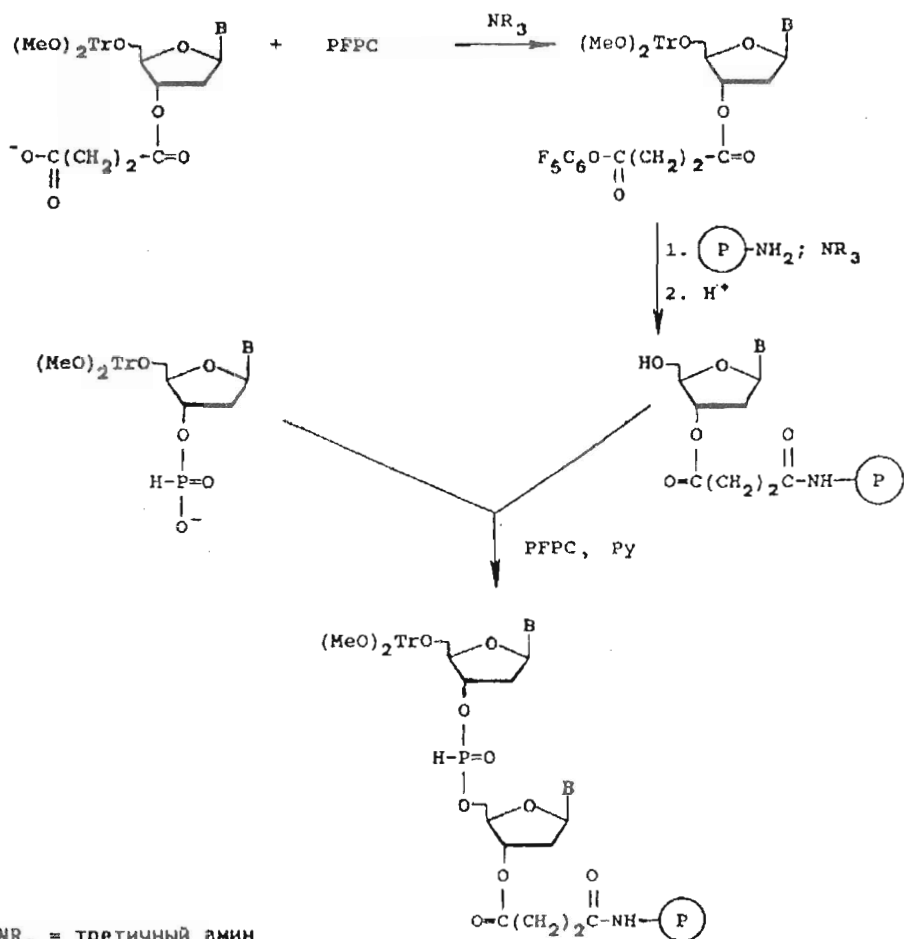
*** Смесью 125 мкл 2-цианэтил-Н-фосфоната (0,05 М) и 125 мкл PFPC (0,15 М) в ацетонитриле, содержащем 33% пиридина.

3'-О-фосфоната 5'-О-диметокситритилтимидина (2 экв.) с 3'-О-бензоилтимидином (1 экв.) в смеси пиридин — ацетонитрил (1 : 2). Как показали наши эксперименты, реакция конденсации протекала несколько медленнее, чем с пивалоилхлоридом, однако тем не менее заканчивалась за 1 мин с практически количественным выходом. Преактивация нуклеотидного компонента с PFPC в течение 10—15 мин до прибавления нуклеозидного компонента не приводила к снижению выхода динуклеотида. В то же время взаимодействие этого реагента с 5'-гидроксильной группой нуклеозидного компонента за время протекания межнуклеотидной конденсации проходило, как и с пивалоилхлоридом, не более чем на 1—2%.

Следует отметить, что скорость модификации гетероциклических оснований под действием PFPC также весьма невелика. Так, при действии 5 экв. этого реагента на 5',3'-ди-О-ацетил-Н-изобутирилгуанозин в смеси ацетонитрил — пиридин (2 : 1) в течение 40 мин нам не удалось с помощью ТСХ обнаружить образование каких-либо количеств O⁶-модифицированного продукта. В аналогичных условиях в присутствии пивалоилхлорида уже за 15 мин выход O⁶-ацильного производного достигал 30%.

В то же время на твердой фазе (стеклянные шарики LCAA-CPG, 30 мкмоль нуклеозида/г, Pierce, США) в стандартных условиях при использовании 0,05 М раствора нуклеотидного компонента и 0,15 М раствора PFPC в смеси пиридин — ацетонитрил (1 : 1) реакция конденсации завершалась за 2—2,5 мин (схема). Проверка эффективности PFPC в автоматическом твердофазном синтезе проводилась нами на примере синтеза олигонуклеотидов длиной от 12 до 40 звеньев на 0,2-, 1- и 10-мкмольном уровнях на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (Mod. 381A, США). Последовательность операций представлена в таблице. Первый нуклеозид присоединяли к носителю также с помощью PFPC через пентафторфениловые эфиры сукцинатов нуклеозидов, как показано на схеме. Количество присоединенного к носителю нуклеозида составляло 30—50 мкмоль/г. После окончания синтеза продукт окисляли действием 2% раствора йода в смеси пиридин — вода (98 : 2) в течение 15 мин, затем олигонуклеотиды удаляли с носителя, деблокировали и очищали, как это описано ранее [7].

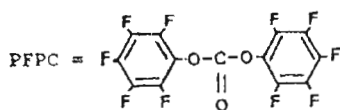
Наиболее обнадеживающие результаты были получены нами при применении PFPC для препаративного автоматического синтеза олигонуклеотидов твердофазным Н-фосфонатным методом. Прямое сравнение эффективности PFPC с пива-



NR_3 = третичный амин

P = LCAA-CPG

B = защищенное гетероциклическое основание



лоилхлоридом было проведено в синтезе 14-звенного олигонуклеотида d (СТТТСТТТТСТСТТ) на 10-мкмольном уровне. В обоих случаях условия синтеза (исходные мономеры, растворители, носитель, кэппинг), окисления, деблокирования и очистки целевого соединения были идентичны. При этом с применением в качестве конденсирующего реагента пивалоилхлорида выход на последней стадии конденсации, определенный с помощью измерения поглощения удаляемой на каждой стадии синтеза диметокситритильной группы, составил около 10% стносительно первого нуклеозида, присоединенного к носителю, а выход целевого соединения после удаления с полимера и предварительной очистки — 5%. В то же время в аналогичных условиях с применением PFPC средний выход на каждой стадии синтеза, по данным денситометрирования тритильной группы, составил 98,5% и выход целевого соединения — около 80% в расчете на первое присоединенное к носителю звено, а выход целевого соединения после предварительной очистки был 52%.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что дипентафтор-

фенилкарбонат является высокоэффективным конденсирующим реагентом для образования межнуклеотидной Н-фосфонатной связи и имеет ряд преимуществ перед традиционными для этого метода конденсирующими реагентами. В настоящее время нами проводятся исследования механизма реакции межнуклеотидной конденсации под действием этого реагента.

Кроме того, РФРС может быть с успехом использован для функционализации твердых носителей. Другими возможными сферами применения этого реагента в химии нуклеиновых кислот является синтез полиамидных и карбаматных аналогов НК, синтез аминоксил-олигонуклеотидов и различных конъюгатов олигонуклеотидов, например с полиэтиленгликолем, пептидами, липидами, а также присоединение биотина и других меток к олигонуклеотидам.

Авторы признательны канд. хим. наук М. В. Безрукову за предоставление образца РФРС и ценные советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garegg P. J., Lindh I., Redberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4054.
2. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
3. Andrus A., Efcavitch J. W., McBride L. J., Guisti B.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 8. P. 861—864.
4. Efimov V. A., Dubey I. Y., Chakhmakhcheva O. G.//Nucleosides and Nucleotides. 1990. V. 9. № 3. P. 473—477.
5. Ефимов В. А., Дубей И. Я.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 211—218.
6. Медведкин В. Н., Мишин Ю. В., Клименко Л. В., Подгорнова Н. Н., Быстриченко А. И., Заболотских В. Ф., Коробейникова Л. И., Поздеева В. В.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 460—464.
7. Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Ефимов В. А.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1145—1148.

Поступило в редакцию
30.VII.1993

V. A. Efimov, A. L. Kalinkina, O. G. Chakhmakhcheva

APPLICATION OF DIPENTAFLUOROPHENYL CARBONATE FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BY THE H-PHOSPHONATE METHOD

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Dipentafluorophenyl carbonate, well known in peptide chemistry, was found to be an effective condensing agent for the internucleotide bond formation in the synthesis of oligonucleotides by the H-phosphonate approach, as well as very convenient for the attachment of the nucleoside succinates to aminated polymer supports. Apparently it can be used in synthesis of various analogues of nucleic acids.