



УДК 547.963.32.07+543.422.23

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОХЛОРИДА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИНУКЛЕОТИДОВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ ДЛЯ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Загребельный С. Н., Яснецкая С. М.

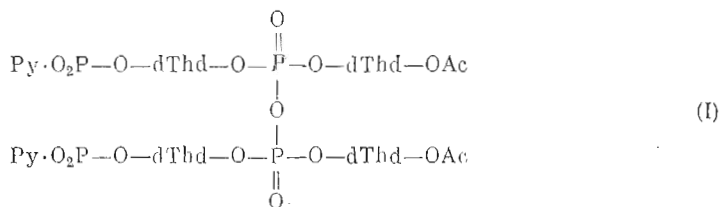
Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ, Новосибирск

Зарытова В. Ф., Лубенец Э. Г., Хмельницкий А. Г.

Институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

Исследована активация динуклеотидов в пиридине с помощью поперечно сшитого полистиролсульфохлорида. Показано, что конечный продукт активации динуклеотида, идентичный конечному продукту взаимодействия динуклеотидов с триизопропилбензолсульфохлоридом, может быть отделен от полистиролсульфохлорида и использован для синтеза олигонуклеотидов. Активированные производные $pdTpdT(Ac)$ и $pbzdApbzdA(Ac)$ были введены в реакцию с $(Tr)dT$ и $(Tr)dTpdT$ соответственно. Выход $(Tr)dTpdTpdT$ 70%, выход $(Tr)dTpdTpdApdA$ 54%.

В работе [1] было показано, что при взаимодействии динуклеотида $pdTpdT(Ac)$ с пятикратным избытком триизопропилбензолсульфохлорида (TPS) образуется высокореакционноспособное производное, имеющее в спектре ^{31}P -ЯМР сигналы при 5,2 и 14,1 м.д., которому приписана структура (I)

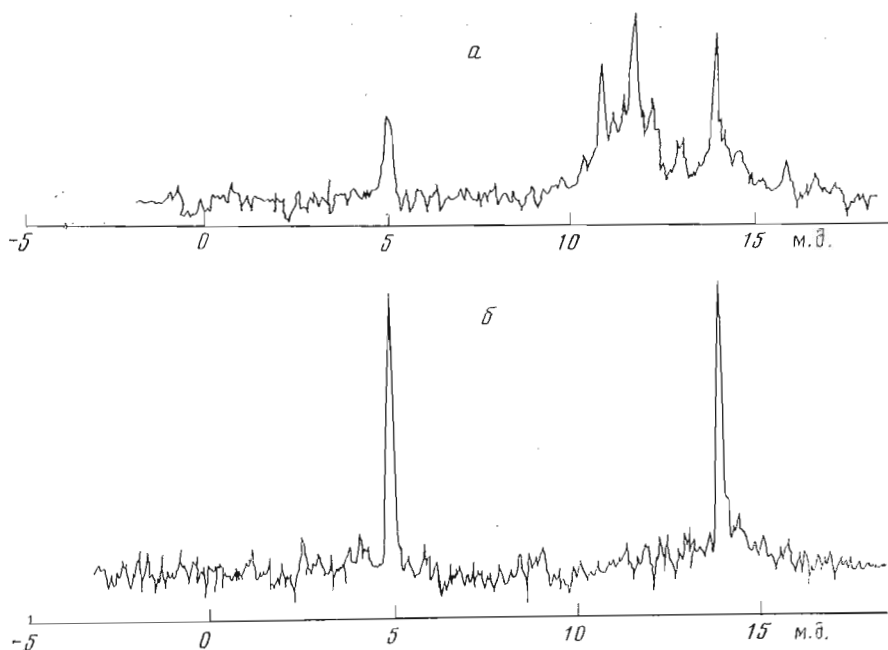


$\text{Py} \cdot \text{O}_2\text{P}$ — фосфорилилпиридиновая группировка [2].

Активное производное (I) взаимодействует с нуклеозидом с образованием тринуклеозиддифосфата, т. е. оно может быть применено для наращивания олигонуклеотидной цепи. Однако для его получения необходимы большие избытки арилсульфохлорида, что приводит к ряду нежелательных последствий: усложняется отделение олигонуклеотидов от продуктов превращения арилсульфохлорида, увеличивается количество сульфонилированных продуктов.

Проблема получения чистых продуктов при синтезе олигонуклеотидов существенно упрощается при использовании нерастворимых полимерных

Сокращения: DCC — диметилдиприлизилкарбодимид, TPS — триизопропилбензолсульфохлорид, PsSO_2Cl — полистиролсульфохлорид.



Спектры ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии 0,025 М $\text{pdTpdT}(\text{Ac})$ и 15 экв. PsSO_2Cl , записанные через 3 (а) и 15 ч (б) после начала реакции

сульфохлоридов [3—6]. В этом случае избыток сульфохлорида, сульфокислоты и побочные сульфонилированные продукты отделяются от реакционной смеси фильтрованием.

Сульфонилирование нуклеозидного компонента можно вообще избежать, если предварительно активировать нуклеотидный компонент с помощью полимерного сульфохлорида и отделить активное производное от полимера перед добавлением нуклеозидного компонента. В работах [6, 7] с применением полистиролсульфохлорида (PsSO_2Cl) были получены активные производные мононуклеотидов, которые после отделения от полимера использовали для синтеза динуклеотидов с выходом 70% [6] и для образования нуклеозид-5'-фосфамидов с выходом, близким к количественному [7].

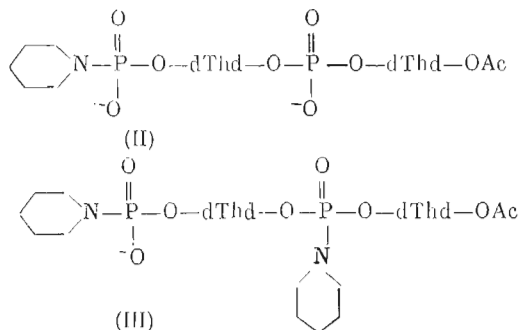
В настоящей работе исследована возможность применения PsSO_2Cl для получения активированных производных динуклеотидов с целью последующего использования их для наращивания олигонуклеотидной цепи блоками.

Активацию проводили при непрерывном перемешивании раствора динуклеотида с 15-кратным избытком * PsSO_2Cl в абсолютном пиридине при 20°C . Процесс контролировали методом спектроскопии ^{31}P -ЯМР, записывая спектры реакционной смеси, отделенной от полимера (рисунок). Группа сигналов в области 10—13 м.д., на долю которых приходится 66% интегральной интенсивности, может быть отнесена по аналогии с данными работ [1, 8] к малоактивным в синтезе олигонуклеотидов тризамещенным пирофосфатам. При дальнейшем выдерживании реакционной смеси с PsSO_2Cl в спектре наблюдается исчезновение сигналов в области 10—13 м.д. и увеличение интенсивности сигналов с δ 5,1 и 14,1 м.д. Через 15 ч эти сигналы являются практически единственными (рисунок). Значения химических сдвигов сигналов и их практически равная интег-

* При определении количества PsSO_2Cl исходили из величины емкости по сульфохлоридным группам, равной 4,5 экв/г.

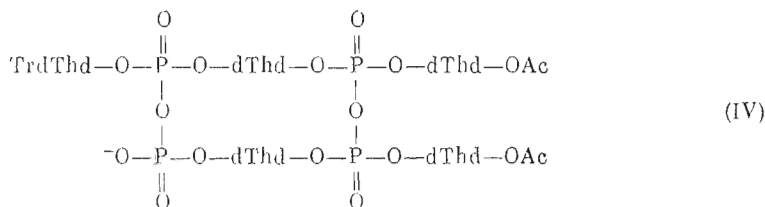
ральная интенсивность позволяет заключить, что конечным продуктом взаимодействия $pdTpdT(AC)$ и полимера, как и в случае с TPS, является соединение (I). Идентичность продуктов взаимодействия динуклеотида с $PsSO_2Cl$ и TPS в совокупности с данными работы [6] свидетельствует о том, что активное производное (I) не содержит в своем составе сульфогруппы.

Соединение (I) наряду с регистрацией методом спектроскопии ^{31}P -ЯМР может быть зарегистрировано по анализу продуктов его взаимодействия с амином, например с пиперидином. Реакция соединения (I) с пиперидином приводит к образованию эквивалентной смеси производных (II) и (III), которые могут быть идентифицированы по данным электрофореза, бумажной хроматографии или ионообменной микроколоночной хроматографии.



Поскольку активацию $pdTpdT(AC)$ проводили в 0,025 М растворе, а для проведения конденсации требуется 0,1 М концентрация динуклеотида, раствор активированного динуклеотида необходимо концентрировать после отделения его от полимера. В контрольном опыте 0,025 М раствор соединения (I) концентрировали до 0,1 М упариванием пиридина в условиях, исключающих попадание влаги. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси при этом не изменился, что свидетельствует о возможности концентрирования разбавленных растворов активного производного (I).

В дальнейшем исследовалось взаимодействие активной формы динуклеотида (I), отделенной от полимера с нуклеозидным компонентом (Tr)dT. Известно [9], что активные производные нуклеотидного компонента реагируют в первую очередь по имеющимся или образующимся межнуклеотидным фосфодиэфирным группам с превращением в малоактивные тризамещенные пирофосфаты. В данном случае при синтезе соединения (Tr)dTpdTpdT образующаяся межнуклеотидная фосфодиэфирная группа может вступать в реакцию с фосфорилпиперидиновой группировкой соединения (I) с образованием вещества (IV).



Поэтому для более полного превращения нуклеотидного компонента необходимо использовать не менее 2 экв. активированного динуклеотида.

При конденсации (Tr)dT с 2 экв. предварительно активированного $pdTpdT(AC)$, по данным бумажной хроматографии, образуется (Tr)dTpdTpdT с выходом 44%. Неполное превращение нуклеозидного компонента, на наш взгляд, могло быть обусловлено превращением активной формы динуклеотида (I) в менее реакционноспособные производ-

Синтез олигонуклеотидных фрагментов с помощью PsSO_2Cl

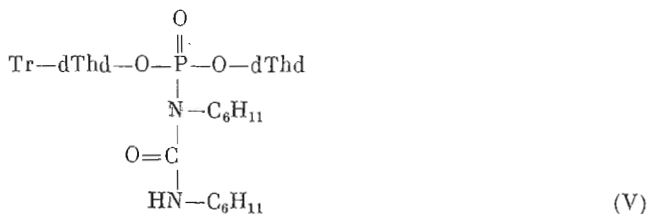
Динуклеотиды	Концентрация динуклеотидов, М		Концентрация нуклеозидного компонента, М	Продукт реакции	Выход, %
	при активации	при конденсации *			
pdTpdT(Ac)	0,025	0,1	0,06 (Tr)dT + +1,5 PsSO_2Cl	(Tr)dTpdTpdT	70
pbzdApbzda(Ac)	0,1	0,1	0,06 (Tr)dTpdT	(Tr)dTpdTpdApdA	54

* Концентрацию проводили в присутствии 1,5 экв. PsSO_2Cl по отношению к динуклеотиду.

ные динуклеотида типа тризамещенных пирофосфатов [2] за счет влаги, внесенной в реакцию смесь с нуклеозидом. Нам представлялось, что введение в реакцию смесь дополнительного количества конденсирующего реагента (1–3 экв. PsSO_2Cl по отношению к динуклеотиду) позволило бы перевести тризамещенные пирофосфатные группировки в соединение (I) и тем самым повысить превращение нуклеозида, не прибегая к использованию дополнительных избытков активированного динуклеотида. Действительно, добавление к активированному динуклеотиду защищенного нуклеозида (Tr)dT вместе с 3 экв. PsSO_2Cl , по данным бумажной хроматографии, повышает выход (Tr)dTpdTpdT до 83%. Ионообменной хроматографией (Tr)dTpdTpdT был выделен с выходом 70% (таблица).

Следующий этап работы заключался в исследовании возможности применения PsSO_2Cl для активации пуриновых динуклеотидов на примере pbzdApbzda(Ac). В спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, получающейся при взаимодействии этого динуклеотида с 15 экв. PsSO_2Cl , наблюдались сигналы при 5,1 и 14 м.д., что совпадает с результатами, полученными при активации pdTpdT(Ac). Следовательно, взаимодействие пуринового динуклеотида с PsSO_2Cl также приводит к активному производному, которое не противоречит структуре (I).

Далее исследовалась конденсация активированного аденозинного динуклеотида с тритильным производным динуклеозидфосфата (Tr)dTpdT. Для более полного превращения нуклеотидного компонента, содержащего фосфодиэфирную группировку, способную мгновенно реагировать с активным производным нуклеотидного компонента типа (I), необходимо было бы использовать не менее 3 экв. pbzdApbzda(Ac). Чтобы избежать применения больших избытков динуклетидов, мы попытались защитить фосфодиэфирную группу нуклеозидного компонента с помощью DCC, который, как показано в работе [10], блокирует эту группу с образованием соединения (V)



Соединение (V) получено при взаимодействии (Tr)dTpdT с 10 экв. DCC в пиридине при 20° С в течение 16 ч. Затем к нему было добавлено 2 экв. предварительно активированного динуклеотида pbzdApbzda(Ac). Через 20 ч конденсацию прекращали добавлением к реакционной смеси воды. После удаления дициклогексилуреидной и N-бензоильной защитной группы и ионообменной хроматографии получено тритильное производное тетра-

нуклеозидтрифосфата (Tr)dTpдTpдApдA с выходом 54% (см. таблицу). Нуклеотидный состав продукта подтвержден полным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда, при котором отношение рdT : рdA составляло 1 : 2.

В процессе активации защищенных по оксигруппам нуклеотидов с помощью PsSO_2Cl происходит необратимая сорбция нуклеотидного материала на полимере. В работе [7] приведены данные по сорбции рdT(Ac), рC(Ac)₃ и рU(Ac)₂. Природа сорбции не установлена, однако при использовании разбавленных растворов во время активации потери нуклеотидного материала за счет сорбции были сведены к 10–15%. При аналогичной активации динуклеотидов получение активированного динуклеотида также сопровождается существенными (28–35%) его потерями. Понижить степень сорбции путем снижения концентрации активируемых динуклеотидов не удалось.

Экспериментальная часть

В работе использовали бистретиламмониевые соли динуклеотидов рdTрdT(Ac) и рbzdArрbzdA(Ac), полистиролсульфохлорид, полученный по [7]. Емкость по сульфохлоридным группам — 4,5 ммоль/г. Перед использованием в реакции навески PsSO_2Cl выдерживали в абсолютном пиридине в течение 4 ч для набухания полистирольной матрицы. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге FN-1 в системах *изо*-пропанол — аммиак — вода, 7:1:2 (А) и этанол — 1 М ацетат аммония, 5:2, рН 7,5 (Б). Ионообменную хроматографию в системе Томлинсона — Тенера проводили на колонках с DEAE-целлюлозой (Serva), используя установку для хроматографии в микромасштабе [11]. Электрофорез проводили на бумаге FN-16 при напряжении 1,5 кВ в течение 45 мин, используя аппарат для горизонтального электрофореза Labor (Венгрия). В качестве буферного раствора применяли 0,03 М бикарбонат аммония, рН 8,0. Электрофоретические подвижности фосфамидных производных динуклеотидов определяли относительно соответствующих динуклеотидов. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-16. Спектры ³¹P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги (δ) измеряли в миллионных долях (м.д.) относительно H₃PO₄ как внешнего стандарта с точностью до 0,1 м.д. Спектры снимали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи ³¹P-¹H}. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл.

Взаимодействие активного производного динуклеотида (I) с пиперидином. Раствор 87 мг (0,1 ммоль) рdTрdT(Ac) и 300 мг (1,5 ммоль) PsSO_2Cl в 4,5 мл абсолютного пиридина перемешивали в течение 15 ч, 0,5 мл раствора активированного динуклеотида приливали к 0,3 мл абсолютного пиперидина. Через 20 мин полученную реакционную смесь упаривали досуха. Остаток анализировали с помощью электрофореза и ВХ в системе Б. Мопиперидиновое производное (II) имеет R_f 0,67, E_f 0,7. Дипиперидиновое производное (III) имеет R_f 0,81, E_f 0,4.

Тринуклеозиддифосфат (Tr)dTpдTpдT. Раствор 174 мг (0,2 ммоль) рdTрdT(Ac) в 8 мл абсолютного пиридина и 700 мг (3 ммоль) PsSO_2Cl перемешивали 15 ч, в сухой камере фильтровали в колбу с 48 мг (0,1 ммоль) (Tr)dT. Реакционную смесь упаривали в условиях, исключающих попадание влаги, до объема 2 мл. Через 3 ч в реакцию вводили 70 мг (0,3 ммоль) PsSO_2Cl и перемешивали 10 ч. Реакционную смесь обрабатывали 1 ч 2 мл воды при 20° С, а затем 2 ч 5 мл 10% раствора аммиака при 20° С. Реакционную смесь упаривали до масла, остаток растворяли в 50 мл 20% этанола, наносили на колонку (1,5×20 см) с DEAE-молселектом А-25 и проводили хроматографию в градиенте концентрации ТЕАВ от 0,05 до 0,45 М (1×1 л). Выход (Tr)dTpдTpдT 1500 ОЕ (70% в расчете на (Tr)dT). R_f 0,78 в системе А.

Тетрануклеозидтрифосфат (Tr)dTpдTpдApдA. Раствор 140 мг (0,11 ммоль) pbzdApbzdA(Ac) в 1,2 мл абсолютного пиридина и 0,4 г (1,7 ммоль) PsSO₂Cl перемешивали 6 ч. Раствор активированного динуклеотида отделяли от полимера и добавляли к 0,5 мл раствора дициклогексилуреидного производного (Tr)dTpдT, полученного из 43 мг (0,05 ммоль) (Tr)dTpдT и 103 мг (0,5 ммоль) DCC по [8]. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С. Далее обрабатывали 24 ч 2 мл воды при 20° С для удаления дициклогексилуреидной защитной группы. Осадок отделяли фильтрованием, промывали 50% пиридином (3×5 мл). Фильтраты объединяли, упаривали до масла. Остаток обрабатывали концентрированным NH₄OH 3 ч при 50° С, реакцию смесь упаривали досуха. Остаток обрабатывали 30 мл смеси хлороформ—вода (1:5). Водный слой наносили на колонку (2×25 см) с DEAE-молселектом А-25 и проводили хроматографию в градиенте концентрации ТЕАВ в 20% этаноле от 0,1 до 0,6 М (1×1 л). Выход (Tr)dTpдTpдApдA — 600 ОЕ₂₆₀ (54% в расчете на (Tr)·дTpдT), R_f 0,55 в системе А. Олигонуклеотид (Tr)dTpдTpдApдA подвергали расщеплению фосфодиэстеразой змеиного яда. Продукты анализировали методом микроколоночной хроматографии на даэксе 1 в формиатном буфере, рН 4. Молярное соотношение продуктов гидролиза pdT : pdA 1 : 2.

Определение сорбции динуклеотидов на PsSO₂Cl. Смесь 90 мг pdTpдT(Ac) (1840 ОЕ₂₆₇) и 250 мг PsSO₂Cl в 1,5 мл абсолютного пиридина перемешивали 17 ч на магнитной мешалке при 20° С. Раствор фильтровали, PsSO₂Cl промывали абсолютным пиридином (3×2 мл). К фильтрату добавляли 15 мл 0,1 М NaHCO₃ и упаривали до маслообразного остатка. Следы пиридина удаляли 3—4-кратным упариванием остатка с водой. Затем измеряли оптическую плотность при 267 нм. Получено 1200 ОЕ₂₆₇, т. е. процент сорбции равен 35. Аналогично определяли процент сорбции для других концентраций pdTpдT(Ac) и pbzdApbzdA(Ac), принимая во внимание процентное содержание исходных препаратов динуклеотидов. Сорбция 0,05 М pbzdApbzdA(Ac) — 32%, сорбция 0,025 М pdTpдT — 28%.

Авторы выражают благодарность А. В. Лебедеву и А. С. Левиной за участие в выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. (1975) Докл. АН СССР, **222**, 97—100.
2. Knorre D. G., Zarytova V. F., Lebedev A. V., Khalimakaya L. M., Sheshefova E. A. (1978) Nucleic Acids Res., **5**, 1253—1272.
3. Rubinstain M., Patchornik A. (1972) Tetrahedron Lett., 2881—2883.
4. Rubinstain N., Patchornik A. (1975) Tetrahedron, **31**, 1517—1519.
5. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Потапов В. К., Резвухин А. И., Туркин С. И., Шабарова З. А. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 9. вып. 4, 152—156.
6. Туркин С. И., Потапов В. К., Шабарова З. А., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) Биоорган. химия, **1**, 1430—1433.
7. Загребельный С. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лубенец Э. Г., Позднякович С. А., Хмельницкий А. Г., Яснецкая С. М. (1978) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 143—147.
8. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф., Урманов И. Х., Шубина Т. Н. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 124—130.
9. 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, вып. 3, 121—125.
10. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. (1976) Биоорган. химия, **2**, 1196—1204.
11. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот (1973) Кнорре Д. Г., Венкстери Т. В., ред., «Наука», М.

Поступила в редакцию
10.XI.1978

После доработки
1.II.1979

**POLYSTYRENE SULPHONYL CHLORIDE APPLICATION FOR PREPARING
DINUCLEOTIDE ACTIVE DERIVATIVES AND THEIR UTILIZATION
IN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS**

ZAGREBELNY S. N., YASNETSKAYA S. M., ZARYTOVA V. F.,
LUBENETS E. G., KHMEL'NITSKY A. G.

*[Special Technology Design Bureau for Biologically Active Compounds,
Novosibirsk; Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The activation of dinucleotides with cross-linked polystyrene sulphonyl chloride in pyridine was investigated. The final product of dinucleotide activation was shown to be identical with the active derivative of dinucleotide formed with triisopropylbenzenesulphonyl chloride. Active derivatives of pdTpdt(Ac) and pbzdApbzdA(Ac) were separated from polystyrene sulphonyl chloride and then used in the reaction with (Tr)dT and (Tr)dTpdt, respectively. The yield of (Tr)dTpdtTpdt was 70%, this of (Tr)dTpdtTpdtApdA was 54%.
