



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 • № 1 • 1980

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

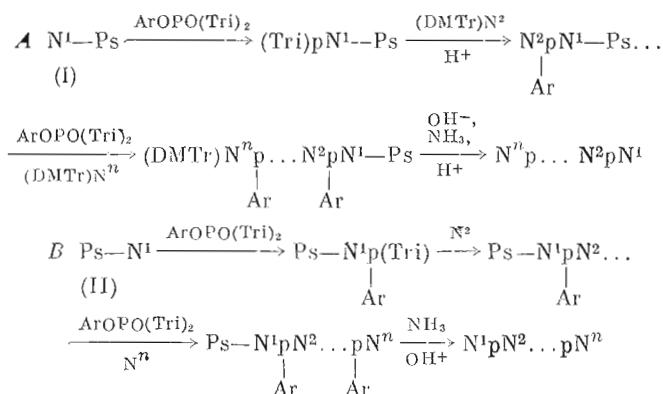
УДК 547.963.32.07

НОВЫЙ МЕТОД ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ ПУТЕМ

Добрынин В. Н., Чернов Б. К., Колосов М. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Во всех традиционных методах твердофазного синтеза олигонуклеотидов к концевому нуклеозиду или нуклеотиду, закрепленному на полимерном носителе, последовательно присоединяют нуклеотиды, активированные заранее или непосредственно в реакционной среде, обычно с помощью арилсульфохлоридов. Нами разработан новый метод, в котором наращивание нуклеотидной цепи осуществляется без применения конденсирующих средств, путем взаимодействия нуклеозидного компонента, прикрепленного к полимеру, с бифункциональным фосфорилирующим реагентом типа $\text{ROP}(=\text{O})\text{XY}$ и затем с мононуклеозидом или олигонуклеотидным блоком. Метод разработан в двух вариантах, A и B (см. схему), различающихся тем, как присоединено к полимеру-носителю первое нуклеозидное звено (через 3'-ОН или 5'-ОН) и в каком направлении растет синтезируемая олигонуклеотидная цепь ($3'\text{-ОН} \leftarrow 5'\text{-P}$ или $3'\text{-P} \rightarrow 5'\text{-OH}$).



Н – N-защищенный нуклеозид или N,P-защищенный динуклеозидфосфат, Ps – полимерный носитель, Ar – n-хлорфенил, Tri – сим-триазол-1-ил, DMTr – n, n'-диметокситритил.

В качестве носителей мы использовали продажные макропористые гипополимеры стирола с дивинилбензолом: бензидриламинную смолу, выпускаемую Protein Research Foundation (сплавка 2%, содержание NH_2

0,4 ммоль/г, 200–400 меш), и полистирол био-бидс фирмы Bio-Rad (спивка 1%, 200–400 меш), в который вводили диметокситритилхлоридные группы по методу [1]. Для приготовления 3'-нуклеозил-полимера (I) аминосмолу сначала ацилировали триазолидом 5'-диметокситритил-3'-нуклеозилсукицинатом (синтезирован из соответствующего кислого эфира и триазола в присутствии дициклогексилкарбодимида), а затем ацетилировали уксусным ангидридом, после чего DMT_r-группу удаляли 1% бензолсульфокислотой в хлороформе. Для получения 5'-нуклеозил-полимера (II) тритилхлоридную смолу обрабатывали в пиридине нуклеозидом и затем метанолом. В обоих полимерах нуклеозидная нагрузка составляла 0,20 ммоль/г.

Все реакции твердофазного синтеза вели без перемешивания, в центрифужной пробирке или в шприце с фильтром, как описано Плессом и Летсингером [2]. Фосфорилирование на полимере проводили в безводном пиридине при помощи 0,7–0,9 М *n*-хлорфенилфосфобистриазолида (20° С, 30 мин), а межнуклеотидные конденсации – с 0,5–0,7 М нуклеозидом или динуклеозидхлорфенилфосфатом в том же растворителе в присутствии 0,2–0,3 М 4-диметиламинопиридина, который является сильным катализатором этих реакций [3]. Конечные олигонуклеотиды выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине при pH 7,5 и затем 3,5.

Вариант *A* был нами исследован на примере получения гептадезокси-нуклеотида C-T-T-T-T-T-T. В этом синтезе длительность конденсаций варьировала от 5 до 20 ч. 5'-Гидроксил деблокировали 1% бензолсульфокислотой в хлороформе и по количеству образовавшегося диметокситритианола, определяемому спектрофотометрически, судили о полноте превращения на данной стадии (каждая стадия включает фосфорилирование, конденсацию и деблокирование). Выход на отдельных стадиях колебался от 75 до 98%, в среднем превышая 85%. После завершения синтеза защищенный олигонуклеотид отщепляли от полимера 0,1 н. щелочью в 98% пиридине (1 ч при 20° С) и подвергали аммонолизу (30% NH₃, 10 ч при 60° С) и гидролизу (80% AcOH, 20 мин при 20° С). Хроматографически гомогенный гептадезоксинуклеотид CT₆ был получен с выходом 3,5%, что соответствует среднему выходу 57% на каждой из 6 стадий, если не учитывать потерю при отщеплении от полимера и деблокировании.

Вариант *B* отличается от *A* прежде всего тем, что межнуклеотидные связи здесь образуются в результате фосфорилирования 5'-оксиоединения 3'-фосфатом (3'-P→5'-OH). Реакционная способность первичной спиртовой группы 5'-OH значительно выше, чем у вторичного гидроксила 3'-OH, благодаря чему, во-первых, 3'-OH можно не защищать и, во-вторых, конденсация протекает быстрее, чем по пути *A*. Так, исходя из 5'-тимидил-полимера (II) и проводя попаременно фосфорилирование бистриазолидом и конденсацию с 3',5'-незащищенным нуклеозидом (1,5–2 ч при 20° С), мы синтезировали олигодезоксинуклеотид T-T-T-T-T-bzC. После аммонолиза (7 ч при 60° С) и отщепления от полимера (80% AcOH, 20 мин при 20° С) был выделен гептадезоксинуклеотид T₆C с выходом 8% (т. е. в среднем 66% на каждой стадии). Нуклеотидная последовательность полученного вещества и отсутствие в нем неприродных 3',3'- и 5',5'-фосфодиэфирных связей были доказаны частичным и полным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда.

Для получения высших олигонуклеотидов синтез в обоих вариантах, *A* и *B*, целесообразно вести блочным способом, используя Р-защищенные динуклеозидфосфаты и их 5'-диметокситритильные производные, удобный метод получения которых описан нами ранее [3]. Так, путем *A* мы синтезировали 11-членный дезоксинуклеотид C-C-T-T-T-T-T-T-T-T в результате присоединения к 3'-тимидил-полимеру (I) четырех «двоек» Tr(PhCl)T и одной bzCp(PhCl)bzC. Конечный ундекадезоксинуклеотид C₂T₉ был выделен с выходом 1% (средний выход на одной стадии около

40%), и его строение было подтверждено методом нуклеотидных карт. Вариант *B* был использован для получения 12-членного дезоксинуклеотида T-T-T-T-T-T-T-G-C путем присоединения к 5'-тимидил-полимеру (II) девяти мономеров T и затем димера ibGp(PhCl)bzC. В этом 10-стадийном синтезе очистка конечного вещества до полной гомогенности, установленной по фингерпринту, осуществлялась при помощи обращенно-фазовой хроматографии (RPC-5 в градиенте концентрации NaOAc); общий выход додекадезоксинуклеотида T₁₀GC составил 0,5%, что соответствует 59% на каждой из 10 стадий.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет быстро синтезировать олигодезоксинуклеотиды той длины, которая обычно бывает необходима для лигазного спlicingа в двухцепочечные полинуклеотиды. В обоих вариантах метода межнуклеотидные связи образуются без применения конденсирующих средств, т. е. без активации или преактивации фосфатного компонента, благодаря чему не происходит порчи нуклеотидов на полимере и (или) в растворе, а взятый в избытке нуклеозид или динуклеозидный блок легко регенерируется. Синтез по этому методу не требует специальной аппаратуры и может быть проведен на продажных макропористых стирольных полимерах, хотя на пелликулярных носителях он, вероятно, будет протекать быстрее и эффективнее.

Авторы выражают благодарность А. Н. Вульфсону за обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Köster H., Cramer F. (1974) Lieb. Ann. Chem., 946–958.
2. Pless R. C., Letsinger R. L. (1975) Nucl. Acids Res., 2, 773–786.
3. Добрынин В. Н., Быстров Н. С., Чернов Б. К., Северцова И. В., Колосов М. Н. (1979) Биоорганическая химия, 5, 1254–1256.

Поступило в редакцию
8.X.1979

A NEW METHOD OF SOLID PHASE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES BY THE PHOSPHOTRIESTER APPROACH

DOBRYNIN V. N., CHERNOV B. K., KOLOSOV M. N.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A rapid method of solid phase synthesis of oligodeoxynucleotides by the phosphotriester approach is described, which employs a 4-dimethylaminopyridine catalyzed two-step phosphorylation with aryl phosphoditriazolidate ArOPO(Tri)₂ in place of the traditional internucleotide coupling by means of arenesulphonyl chlorides or azolides. In the new method, a nucleoside anchored on a polymer support through its 3'- or 5'-hydroxyl reacts with the bifunctional phosphorylating reagent and then with a 5'-dimethoxytritylated or 3', 5'-unprotected nucleoside (or the corresponding P-protected dinucleoside phosphate), the nucleotide chain being thus grown in the direction 3'-OH ← 5'-P (the pathway A) or 3'-P → 5'-OH (the pathway B), respectively. The method is exemplified by the synthesis of oligodeoxynucleotides CT₆, T₆C, C₂T₉, and T₁₀GC (in the overall yield of 3.5, 8, 1, and 0.5%, respectively) on two commercially available macroporous crosslinked polystyrenes.