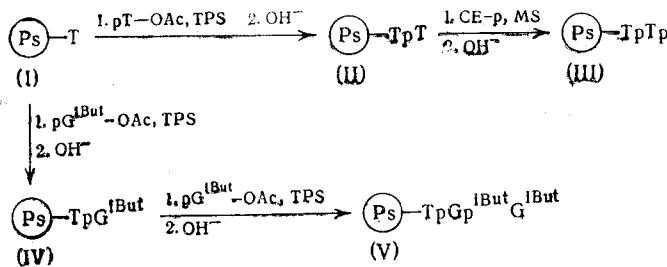


В. К. ПОТАПОВ, В. В. ЗВЕЗДИНА, М. Н. КОЧЕТКОВА, З. А. ШАБАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

## ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ БЛОКОВ НА ВЫСОКОСШИТОМ ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

Несмотря на значительное число работ по синтезу олигонуклеотидов на различных полимерных носителях<sup>(1-3)</sup>, препаративный вариант получения даже коротких олигонуклеотидов практически не описан. Ранее<sup>(4)</sup> нами была показана принципиальная возможность твердофазного синтеза трех-четырехчленных олигонуклеотидных блоков в количестве 0,02–0,2 ммоля. В целях дальнейшей отработки препаративного синтеза олигонуклеотидов на высокосшитом полимерном носителе в настоящей работе осуществлен синтез двух блоков состава TpT и TpGpG, а также изучена возможность фосфорилирования одного из них для получения олигонуклеотида, содержащего фосфор в 3'-положении. Синтез проводился на новом макропористом высокосшитом полимерном носителе по следующей схеме:



Полимерный носитель был получен сополимеризацией стирола, дивинилбензола и *n*-метокси-*n'*-винилтрифенилкарбинола<sup>(5)</sup> в объемном соотношении 3 : 2, 5 : 1 в присутствии октана (40% от объема смеси мономеров). Полученный полимер переводился в активную форму хлорированием хлористым ацетилом. Содержание хлора составило 1,4%, что соответствовало 400 мкмоль активных центров на 1 г полимерного носителя. Присоединение тимидина к полимеру проводилось путем обработки носителя тимидином (140 мг на 1 г полимера) в абс. пиридине в течение 17 час. при 17°. Количество присоединенного нуклеозида определялось после обработки полимер-тимидина (I) 2% трифтормускусной кислотой в абс. бензole и составляло 55 мг (227 мкмоль) на 1 г носителя. Таким образом, модификации подверглось 69% активных центров.

Как видно из приведенной схемы, нуклеозидным компонентом в синтезе служил полимер-нуклеозид (I) или, после проведения конденсации, полимер-динуклеозидфосфат (II, IV); нуклеотидным – 3'-О-ацетилтимидиловая и N-изобутирил-3'-О-ацетилдезоксигуаниловая кислота. Конденсация проводилась в присутствии триизопропилбензольсульфокислоты (TPS) в абс. пиридине по обычной методике<sup>(2-4)</sup>. Условия проведения конденсации и выходы синтезированных олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

В отличие от результатов, полученных ранее на низкосшитом полимерном носителе<sup>(4)</sup>, при проведении конденсации полимер-динуклеозидфосфата (IV) с защищенной гуаниловой кислотой, несмотря на образование тринуклеозиддифосфата (23% относительно TpG<sup>iBut</sup>), количество TpG<sup>iBut</sup>

на полимерном носителе не только не уменьшилось, а даже несколько возросло (до 37%). Эти данные свидетельствуют о том, что в реакцию вступило дополнительно около 10% тимицина, не прореагировавшего при первой конденсации. Это обстоятельство позволяет надеяться на увеличение выхода при повторном проведении каждой стадии конденсации.

Таблица 1

Нуклеозидный компонент	Фосфорилирующий агент	Мольное соотношение		Продолж. реакц., час.	Продукт реакц.	Выход, %	
		нуклеотид : нуклеозид	TPS: нуклеотид			на стадии	общий
(Ps)-T	pT - OAc	3	4	16	TpT	69	69
(Ps)-T	pG <sup>iBut</sup> - OAc	3	4	16	TpG	34	34
(Ps)-TpG <sup>iBut</sup>	pG <sup>iBut</sup> - OAc	3	4	16	TpGpG	23	8
(Ps)-TrT	β-Цианэтилфосфат	2	3 *	86	TpTr	79	56

\* В качестве конденсирующего агента использован мезитиленсульфохлорид.

Селективное удаление ацетильной защиты с 3'-гидроксильной группой осуществлялось обработкой полимера 0,2 M раствором едкого кали в смеси метанол — диоксан (1 : 9 по объему) в течение 12 час. при 20°. При получении продукта II было использовано 10 г полимерного носителя, содержащего 490 мг (2 ммоля) тимицина; таким образом было получено 800 мг (1,4 ммоля) тимицилил-(3' → 5')-тимицина. Синтез соединения V осуществлен на 15 г полимерного носителя (1,53 г, 4 ммоля тимицина), при этом

Таблица 2

Соединение	R <sub>f</sub> <sup>2</sup>			U <sub>отн</sub>	Соединение	R <sub>f</sub>			U <sub>отн</sub>
	A	B	F			A	B	F	
T	0,65	0,67	0,66	0	TpG <sup>iBut</sup> - OAc		0,72	0,83	0,51
pT	0,43	0,30		1,0	TpG <sup>iBut</sup>		0,54	0,50	
pG	0,44	0,28	0,29	1,0	TpG <sup>2</sup>	0,27	0,25	0,33	0,46
pG <sup>iBut</sup>		0,52	0,51		TpGpG <sup>2</sup>	0,11	0,22	0,17	0,65
pG <sup>iBut</sup> - OAc	0,65	0,67			TpT		0,38	0,42	0,5
					TpTr	0,08	0,20		1,0

П р и м е ч а н и я. 1. А — система: изопропанол — аммиак — вода 7 : 1 : 2; В — n-бутанол — уксусная кислота — вода 5 : 2 : 3; F — изомасляная кислота — аммиак — вода 66 : 1 : 33. 2. Молярное соотношение продуктов после ферментативного гидролиза: для TpG и TpGpG: TpG = 1/1,1 и 1/1,85 соответственно.

было получено 750 мг (0,9 ммоля) тимицилил-(3' → 5')-гуанозина и около 200 мг (0,21 ммоля) тимицилил-(3' → 5')-гуанилил-(3' → 5')-гуанозина.

Для изучения возможности синтеза на полимерном носителе олиго-нуклеотидных блоков, содержащих фосфатную группу на 3'-конце было предпринято фосфорилирование полимер-диинуклеозидфосфата (II) β-цианэтилфосфатом в присутствии мезитиленсульфохлорида по методу Летзингера (<sup>6</sup>). Выход динуклеотида (III) при этом составил 79% за 86 час. даже при использовании всего лишь двухкратного избытка фосфорилирующего агента.

Идентификация всех полученных соединений проводилась после удаления продуктов синтеза с полимера и разделения смеси методом электрофореза и хроматографии на бумаге. Структуру олигонуклеотидов доказывали гидролизом фосфодиэстазой змеиного яда после удаления всех

защитных групп с последующим спектрофотометрическим определением продуктов гидролиза. Соответствующие данные приведены в табл. 2. Вещества характеризовались данными электрофореза и хроматографии на бумаге (табл. 2), а также у.-ф. спектрами. Для олигонуклеотидов, содержащих гуаниловую кислоту, получены следующие характеристики:

TpG:  $\lambda_{\max}$  255,  $\lambda_{\min}$  234,  $\frac{E_{250}}{E_{260}}$  1,0;  $\frac{E_{270}}{E_{260}}$  0,195;  $\frac{E_{280}}{E_{260}}$  0,71;  $\frac{E_{290}}{E_{260}}$  0,38.

Tp GpG:  $\lambda_{\max}$  259,  $\lambda_{\min}$  234,  $\frac{E_{250}}{E_{260}}$  0,89;  $\frac{E_{270}}{E_{260}}$  0,93;  $\frac{E_{280}}{E_{260}}$  0,66;  $\frac{E_{290}}{E_{260}}$  0,32.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
24 VII 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. L. Letsinger, V. Mahadevan, J. Am. Chem. Soc., **87**, 3526 (1965).  
<sup>2</sup> R. Melby, D. R. Stroback, J. Org. Chem., **34**, 421 (1969). <sup>3</sup> О. Г. Чехмакчева, В. К. Потапов и др., ДАН, **196**, № 2, 360 (1974). <sup>4</sup> В. Ф. Зарытова, В. К. Потапов и др., ДАН, **199**, № 5, 1072 (1971). <sup>5</sup> В. К. Потапов, М. Н. Кошеткова и др., ЯХОХ, **41**, 420 (1971). <sup>6</sup> T. Shimidzu, R. L. Letsinger, Bull. Chem. Soc. Japan, **44**, 1673 (1971).