

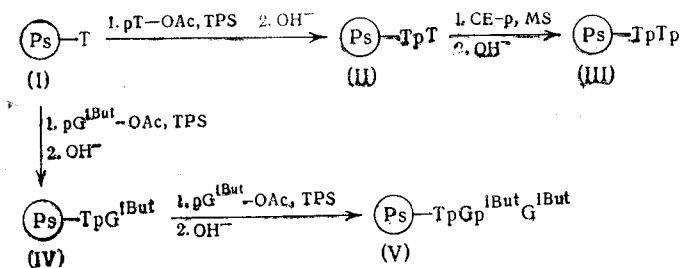
УДК 547.963.32+542.952.6

ХИМИЯ

В. К. ПОТАНОВ, 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 (¹⁻³), препаративный вариант получения даже коротких олигонуклеотидов практически не описан. Ранее (⁴) нами была показана принципиальная возможность твердофазного синтеза трех-четырёхчленных олигонуклеотидных блоков в количестве 0,02—0,2 ммоль. В целях дальнейшей отработки препаративного синтеза олигонуклеотидов на высокосшитом полимерном носителе в настоящей работе осуществлен синтез двух блоков состава ТрТ и ТрGrG, 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 (⁵) в объемном соотношении 3 : 2, 5 : 1 в присутствии октана (40% от объема смеси мономеров). Полученный полимер переводился в активную форму хлорированием хлористым ацетилем. Содержание хлора составило 1,4%, что соответствовало 400 $\mu\text{моль}$ 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% трифторуксусной кислотой в абс. бензоле и составляло 55 мг (227 $\mu\text{моль}$) 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 триэтилопропилбензолсульфохлорида (TPS) в абс. пиридине по обычной методике (²⁻⁴). Условия проведения конденсации и выходы синтезированных олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

В отличие от результатов, полученных ранее на низкосшитом полимерном носителе (⁴), при проведении конденсации полимер-динуклеозидфосфата (IV) с защищенной гуаниловой кислотой, несмотря на образование тринуклеозиддифосфата (23% относительно TrG^{iBut}), количество TrG^{iBut}

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% тимидина, не прореагировавшего при первой конденсации. Это обстоятельство позволяет надеяться на увеличение выхода при повторном проведении каждой стадии конденсации.

Т а б л и ц а 1

Нуклеозидный компонент	Фосфорилирующий агент	Молярное соотношение		Продолж. реакц., час.	Продукт реакц.	Выход, %	
		нуклеотид : нуклеозид	TPS: нуклеотид			на стадии	общий
$\textcircled{\text{Ps}}\text{---T}$	pT — OAc	3	4	16	TrT	69	69
$\textcircled{\text{Ps}}\text{---T}$	pG ^{iBut} — OAc	3	4	16	TrG	34	34
$\textcircled{\text{Ps}}\text{---TrG}^{\text{iBut}}$	pG ^{iBut} — OAc	3	4	16	TrGrG	23	8
$\textcircled{\text{Ps}}\text{---TrT}$	β -Цианэтилфосфат	2	3*	86	TrTr	79	56

* В качестве конденсирующего агента использован мезитиленсульфохлорид.

Селективное удаление ацетильной защиты с 3'-гидроксильной группы осуществлялось обработкой полимера 0,2 М 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 ммоль) тимидина; таким образом было получено 800 мг (1,4 ммоль) тимидил- (3' → 5')-тимидина. Синтез соединения V осуществлен на 15 г полимерного носителя (1,53 г, 4 ммоль тимидина), при этом

Т а б л и ц а 2

Соединение	R _f ²			U _{отн}	Соединение	R _f			U _{отн}
	A	B	F			A	B	F	
T	0,65	0,67	0,66	0	TrG ^{iBut} — OAc		0,72	0,83	0,51
pT	0,13	0,30		1,0	TrG ^{iBut}		0,54	0,50	
pG	0,14	0,28	0,29	1,0	TrG ²	0,27	0,25	0,33	0,46
pG ^{iBut}		0,52	0,51		TrGrG ²	0,11	0,22	0,17	0,65
pG ^{iBut} — OAc		0,65	0,67		TrT		0,38	0,42	0,5
					TrTr	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 TrG и TrGrG: TrG = 1/1,1 и 1/1,85 соответственно.

было получено 750 мг (0,9 ммоль) тимидил- (3' → 5')-гуанозина и около 200 мг (0,21 ммоль) тимидил- (3' → 5')-гуанил- (3' → 5')-гуанозина.

Для изучения возможности синтеза на полимерном носителе олигонуклеотидных блоков, содержащих фосфатную группу на 3'-конце было предпринято фосфорилирование полимер-динуклеозидфосфата (II) β -цианэтилфосфатом в присутствии мезитиленсульфохлорида по методу Летзингера (6). 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 фосфодиэстеразой 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:

$$\text{TpG: } \lambda_{\max} 255, \lambda_{\min} 231, \frac{E_{250}}{E_{260}} 1,0; \frac{E_{270}}{E_{260}} 0,195; \frac{E_{280}}{E_{260}} 0,71; \frac{E_{290}}{E_{260}} 0,38.$$

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

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. L. Letsinger, V. Mahadevan, J. Am. Chem. Soc., 87, 3526 (1965).
² R. Melby, D. R. Strobach, J. Org. Chem., 34, 421 (1969). ³ О. Г. Чехмахчева, В. К. Потапов и др., ДАН, 196, № 2, 360 (1971). ⁴ В. Ф. Зарытова, В. К. Потапов и др., ДАН, 199, № 5, 1072 (1971). ⁵ В. К. Потапов, М. Н. Кочеткова и др., ЖОХ, 41, 420 (1971). ⁶ T. Shimidzu, R. L. Letsinger, Bull. Chem. Soc. Japan, 44, 1673 (1971).