

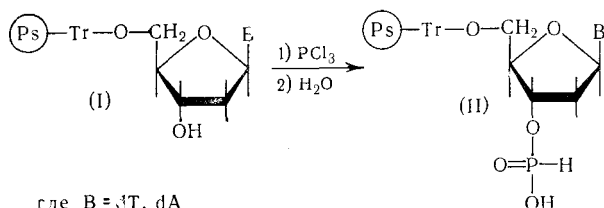
УДК 547.963.32

ХИМИЯ

М. М. КАБАЧНИК, В. К. ПОТАПОВ, З. А. ШАБАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

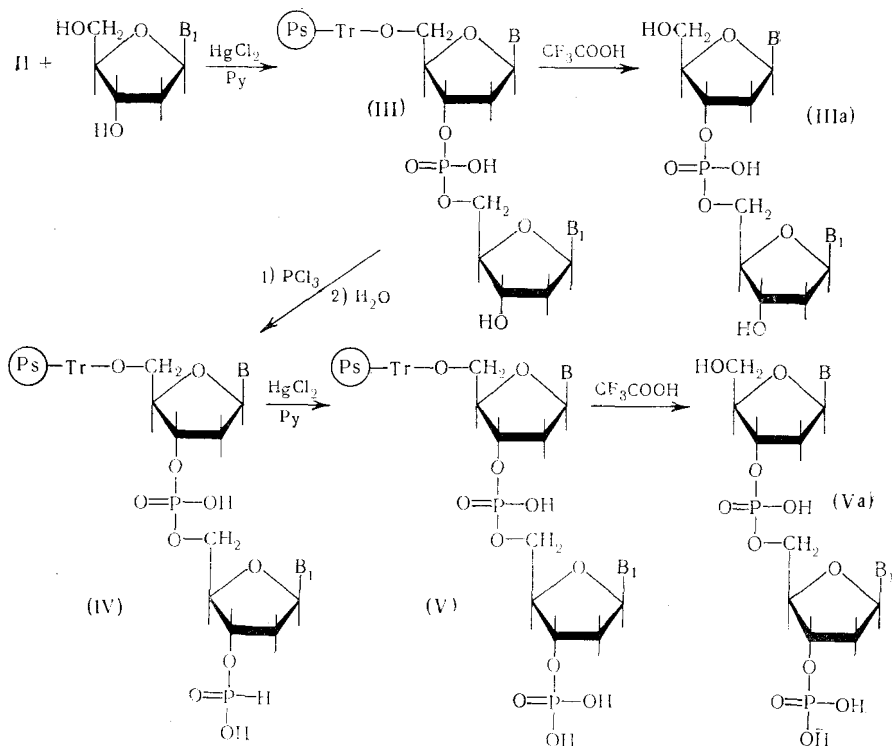
# НОВЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Существующие в настоящее время методы создания межнуклеотидной связи требуют применения защитных групп в нуклеозидной и нуклеотидной компонентах (по оксигруппе рибозы и по аминогруппе гетероцикла) и активации фосфорного остатка одним из конденсирующих агентов (<sup>1-3</sup>). В настоящей работе сделана попытка использовать описанную нами ранее (<sup>4</sup>) реакцию окисления фосфита нуклеозида сулемой для образования 3'—5'-межнуклеотидной связи без применения конденсирующих агентов. В качестве объекта исследования были взяты дезокси-нуклеозиды, присоединенные 5'-гидроксильной группой рибозы к полимерному носителю — сополимеру стирола и дивинилбензола (40%), модифицированному монометокситритилхлоридными группировками. Фосфорилирование нуклеозида (I) проводилось обработкой треххлористым фосфором в среде абсолютного пиридина при 2° в течение 1 часа с последующим гидролизом водой образуемого при этом на носителе нуклеозиддихлорфосфита.



Полученный таким путем полимер — нуклеозидфосфит (II) вводился в реакцию окислительного фосфорилирования в присутствии второй нуклеозидной компоненты и сулемы в среде абсолютного пиридина. Реакция проводилась при 40—50° в течение 5 час., после чего реакционная смесь выдерживалась ночь при комнатной температуре. Происходящее при этом окисление 3'-фосфитной группы полимер-нуклеозидфосфита (II) сопровождается образованием межнуклеотидной 3' → 5'-связи, в результате чего образуется полимер-динуклеозидфосфат (III).

Динуклеозидфосфат или удаляли с полимерного носителя, или вновь фосфорилировали треххлористым фосфором и окисляли сулемой до соответствующего полимер-динуклеотида (V). Все нуклеозиды вводились в реакцию с незащищенными гидроксильными и аминными группами. Во всех случаях, когда использовались производные цитидина, гуанозина и аденозина фосфорилирование по аминогруппе гетероцикла не наблюдалось. Динуклеозидфосфаты и динуклеотиды удаляли с носителя действием 2% раствора трифторуксусной кислоты в бензоле. С помощью ферментативного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного ядра с последующим определением соотношения нуклеозид — нуклеотид было показано, что межнуклеотидная связь в соединениях IIIa и Va является 3'—5'-связью. Выходы полученных таким путем динуклеозидфосфатов и динуклеотидов (IIIa и Va) приведены в табл. 1.



$\text{B}_1 = \text{U}, \text{dT}, \text{dC}, \text{dG}, \text{dA}.$

В описанной реакции в качестве нуклеозидной компоненты может быть использован не только нуклеозид, но и динуклеозидфосфат. В последнем случае после удаления с полимера с выходом 12% (считая на присоединенный к полимеру нуклеозид) был получен тринуклеозиддифосфат.

С целью изучения возможности блочного синтеза олигонуклеотидов фосфит динуклеозидфосфата (IV), полученный в результате обработки присоединенного к полимеру динуклеозидфосфата треххлористым фосфо-

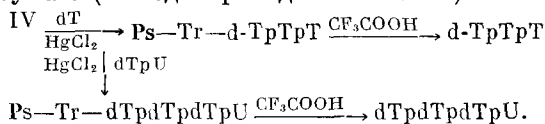
Таблица 1

| Олигону-<br>клеотиды | Выход на стадии<br>образования<br>межнуклеотидной<br>связи, % | Выход олигону-<br>клеотидов *, % | Олигону-<br>клеотиды | Выход на стадии<br>образования<br>межнуклеотидной<br>связи, % | Выход олигону-<br>клеотидов *, % |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| d-TrT                | 80                                                            | 74                               | d-TrTp               | 80                                                            | 52                               |
| d-TrU                | 46                                                            | 38                               | d-TrGp               | 52                                                            | 21                               |
| d-TrC                | 55                                                            | 46                               | d-ApTp               | 78                                                            | 30                               |
| d-TrG                | 58                                                            | 28                               | d-TrTpT              | 51                                                            | 20                               |
| d-TrA                | 76                                                            | 32                               | dTpdpTpU             | 31                                                            | 12                               |
| d-ApT                | 72                                                            | 41                               | dTpdpTpU             | 40                                                            | 23                               |

\* Приводится выход олигонуклеотидов, считая на присоединенный к полимерному носителю нуклеозид.

ром с последующим гидролизом водой, вводился в реакцию окислительно-го фосфорилирования с другим нуклеозидом или динуклеозидфосфатом с образованием в первом случае тринуклеозиддифосфата, а во втором —

тетрануклеозидтрифосфата, которые были выделены при помощи хроматографии на бумаге (выходы приведены в табл. 2).



Строение полученных олигонуклеотидов доказывали определением соотношения гетероциклических оснований после кислотного гидролиза 6*N* HCl при 105° в течение 24 час. Природа межнуклеотидной связи была доказана ферментативным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда.

Таким образом, методом окислительного фосфорилирования можно получать ди- и олигонуклеотиды без применения конденсирующих агентов и без предварительной защиты амино- и оксигрупп, с общим выходом (считая на присоединенный к полимеру нуклеозид) 20—50%. Преимуществом этого метода является простота проведения синтеза, что позволяет ре-

Таблица 2

| Олигонуклеотиды | $R_f$ в системах |      |      | $U_{\text{отн}}$ | Соотношение гетероциклических оснований после кислотного гидролиза 6 <i>N</i> HCl | Соотношение нуклеоз д-нуклеотид после ферментативного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда |
|-----------------|------------------|------|------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | A                | B    | C    |                  |                                                                                   |                                                                                               |
| d-TpT           | 0,42             | 0,36 | 0,45 | 0,48             | —                                                                                 | 1 : 0,99                                                                                      |
| dTpU            | 0,35             | 0,24 | 0,46 | 0,5              | 1 : 1,02                                                                          | 1 : 1                                                                                         |
| d-TpC           | 0,36             | 0,31 | —    | 0,41             | 1 : 0,87                                                                          | 1 : 0,92                                                                                      |
| d-TpG           | 0,24             | 0,3  | 0,38 | 0,46             | 1 : 0,96                                                                          | 1 : 0,98                                                                                      |
| d-TpA           | 0,32             | 0,35 | 0,46 | 0,44             | 1 : 1,27                                                                          | 1 : 0,89                                                                                      |
| d-ApT           | 0,32             | 0,33 | 0,45 | 0,44             | 1 : 1,07                                                                          | 1 : 1,02                                                                                      |
| d-TpTp *        | 0,04             | 0,15 | 0,21 | 1,1              | —                                                                                 | 1 : 1                                                                                         |
| d-TpGp *        | 0,04             | —    | 0,16 | 0,99             | 1 : 0,88                                                                          | 1 : 0,96                                                                                      |
| d-ApTp *        | 0,04             | 0,14 | —    | 1,06             | 1 : 0,91                                                                          | 1 : 0,93                                                                                      |
| d-TpTpT         | 0,19             | —    | 0,26 | 0,78             | —                                                                                 | 1 : 1,89                                                                                      |
| dTpdpTpU        | 0,21             | —    | —    | 0,82             | 1 : 1,76                                                                          | 1 : 1,81                                                                                      |
| dTpdpTpTpU      | 0,1              | —    | 0,16 | 0,71             | 1 : 3,3                                                                           | —                                                                                             |

\* В случае динуклеотидов сначала проводился гидролиз фосфоэстеразой змеиного яда до соответствующего динуклеозидфосфата.

комендовать этот метод не только для синтеза олигонуклеотидов на носителях, но и для введения, например, меченого фосфора в виде концевой или межнуклеотидного фосфата в молекулу олигонуклеотида.

Общие методы. Хроматографическое разделение проводилось на бумаге Ватман № 2 в системах: изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2) (A), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 3) (B), 1 *M* ацетат аммония — этанол (7 : 3) (C). Электрофорез проводили на установке для высоковольтного горизонтального фореза в 0,05 *M* триэтиламмонийбикарбонатном буфере, pH 7,5. Электрофоретическая подвижность ( $U_{\text{отн}}$ ) измерялась относительно 5'-дезокситимидиловой кислоты.

Синтез 3'-фосфитов нуклеозидов (динуклеозидфосфатов). К 200 мг полимерного носителя, содержащего 10—30 μмол. нуклеозида (или 10 μмол. динуклеозидфосфата) в 2 мл абсолютного пиридина добавляют 0,2 мл (2 : 3 μмол.) треххлористого фосфора при +2°. Смесь перемешивают в течение 1 часа, раствор фильтруют без доступа влаги воздуха, полимер несколько раз промывают абсолютным диоксаном, водным диоксаном (1 : 1), водой, спиртом, эфиром и высушивают в вакууме.

Синтез олигонуклеотидов. К 200 мг полимера с нуклеозидфосфитом II (или 3'-фосфитом динуклеозидфосфата IV) в 5 мл абсолют-

ного пиридина добавляют 135—271 мг (0,5—1 ммол.)  $\text{HgCl}_2$  и 0,4 ммол. лиофилизованного нуклеозида (динуклеозидфосфата). Реакционную смесь перемешивают при 40—50° 6 час. и оставляют на ночь при комнатной температуре. Полимер отфильтровывают, отмывают диоксаном, водой, ацетоном, высушивают в вакууме. Олигонуклеотид удаляют с полимерного носителя действием 2% раствора трифторуксусной кислоты в абсолютном бензоле в течение 10—15 мин. при 10°. Трифторуксусную кислоту упаривают, олигонуклеотид экстрагируют водным диоксаном (1:1), полимер отфильтровывают, фильтрат упаривают и хроматографируют. Хроматографические и электрофоретические данные, а также данные кислотного и ферментативного гидролизом приведены в табл. 2. Тринуклеозиддифосфат dTpдTpU и тетрануклеозидтрифосфат dTpдTpдTpU дают положительную реакцию на дис-гликольную группировку.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
3 V 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Nikoyla Hajatsu, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3182 (1966).  
<sup>2</sup> G. M. Tener, H. G. Khorana et al., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6223 (1958). <sup>3</sup> F. Grammer, A. Franke et al., Chem. Ber., **101**, 944 (1968). <sup>4</sup> М. И. Кабачник, В. К. Потапов и др., ДАН, **195**, № 5, 1107 (1970).