

УДК 547.962.32

ХИМИЯ

В. Д. СМЕРНОВ, К. И. РАТМАНОВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 3'-ФОСФАТОВ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Подавляющее большинство современных методов синтеза олигодезоксирибонуклеотидов предусматривает использование 5'-фосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов в качестве нуклеотидного компонента на стадии наращивания олигонуклеотидной цепи (¹, ²). При этом наращивание цепи осуществляется в направлении от 5'- к 3'-концу. Исключение составляют некоторые варианты триэфирного (³, ⁴) и твердофазного (³, ⁵) методов синтеза. В последнее время схема синтеза с использованием 5'-фосфатсодержащих нуклеотидных блоков получила дальнейшее развитие благодаря введению в практику экстракционного метода выделения олигонуклеотидов (⁶).

В то же время два обстоятельства — трудность применения экстракционного метода для выделения 5'-фосфатов олигонуклеотидов и пониженная нуклеофильность 3'-гидроксильной группы нуклеозидного компонента по сравнению с 5'-гидроксильной (⁷) — наталкивают на мысль об использовании 3'-фосфатсодержащих производных олигонуклеотидов при наращивании полинуклеотидной цепи.

Недавно нами был предложен метод синтеза 3'-фосфатов 5'-О-метокситритилированных моно- и олигонуклеотидов, позволивший получать эти соединения с выходом, близким к количественному, и выделять их из реакционной смеси быстрым и удобным методом экстракции (⁸).

Таблица 1

Условия синтеза, выход и хроматографические характеристики защищенных олигонуклеотидов

Соединение	Количество нуклеотидного компонента, ммол на 1 ммол нуклеозидного компонента	Конденсирующий агент, число г-экв. на 1 экв. фосфата	Время реакции, час	Выход, %	R _f в системах *		
					А	Б	В
d(MeOTr)T-T	2	9	48	64	0,25	0,67	0,38
d(MeOTr)T-T-T(iBu)	4	7,5	76	30			
d(MeOTr)T-T-T-T(iBu)	3	1	5	34	0,27	0,65	0,05
d(MeOTr)T-anC	2	1	7,5	76			
d(MeOTr)T-anC-T-T-T-T-T(iBu)	3	1	4,5	27			

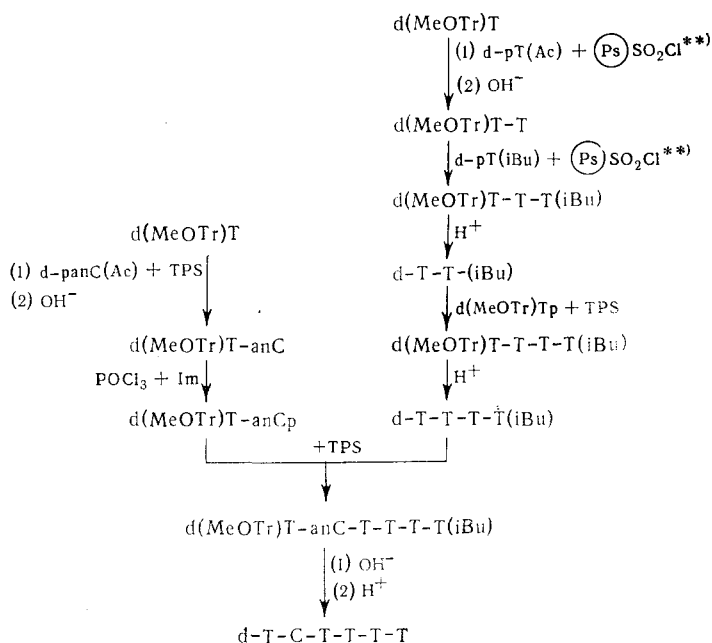
* Контроль за экстракцией проводили хроматографией в тонком слое силикагеля (пластинки «Silufol») в смеси вода — ацетонитрил (8:92) — система А; (15:85) — система Б; (20:80) — система В.

Некоторые характеристики синтезированных олигонуклеотидов

Соединение	R_f в систе- мах *		Электрофоретическая подвижность относительно d-pT (pH 7,5)	Молярная концентрация NaCl при аналитиче- ском выделе- нии по Темлинсо- ну — Тенеру	Соотношение продуктов гидролиза фосфоэста- разой змеиного яда
	Г	Д			
d-T-T-T	0,33	0,16	0,62	0,07	T:pT=1:2,02
d-T-T-T-T	0,29	0,11	0,79	0,09	T:pT=1:3,16
d-T-C			0,39	0,02	T:pC=1:1,1
d-T-C-T-T-T-T	0,25	0,02		0,14	T:pT:pC=1:3,9:0,9

* Хроматографию на бумаге проводили в системах: *n*-пропанол — аммиак — вода (55:10:35) — система Г и *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (50:20:30) — система Д.

Эта работа позволила нам развить новый подход к синтезу олигодезоксирибонуклеотидов в растворе, предусматривающий использование 3'-фосфатов моно- и олигонуклеотидов и наращивание олигонуклеотидной цепи от 3'- к 5'-концу *:



Условия синтеза и некоторые характеристики полученных соединений приведены в табл. 1.

Динуклеозидфосфат d(MeOTr)T-anC синтезирован с использованием TPS в качестве конденсирующего агента и выделен из реакционной смеси экстракцией *n*-бутанолом в этилацетате (15:85). Динуклеозидфосфат d(MeOTr)T-T и тринуклеозиддифосфат d(MeOTr)-T-T-T(iBu) получены с применением макропористого полистиролсульфохлорида ⁽¹⁰⁾. При этом на стадии синтеза тринуклеозиддифосфата в качестве нуклеотидного компонента в реакцию вводили d-pT(iBu), что обеспечивает большую устойчивость 3'-блокирующей группы по сравнению с 3'-ацетильной ⁽²⁾ на

* Сокращенные обозначения моно- и олигонуклеотидов даны по ⁽⁹⁾.

** Макропористый полистиролсульфохлорид.

последующих стадиях синтеза. После удаления метокситритильной группы (80% уксусная кислота, 20°, 1,5 час) полученный d-T-T-T(iBu) использовали в качестве нуклеозидного компонента, который на следующей стадии синтеза участвует в образовании фосфодиэфирной связи в качестве донора 5'-гидроксила.

Нуклеотидные компоненты синтеза d(MeOTr)Tp и d(MeOTr)T-anCp получены обработкой соответствующих защищенных нуклеозида и динуклеозидфосфата смесью имидазола и хлорокиси фосфора⁽⁸⁾ и выделены экстракцией смесью *n*-бутанола и хлористого метилена (10:90) и (30:70) соответственно. Характеристики продуктов фосфорилирования полностью соответствовали ранее описанным⁽⁸⁾.

Синтез тетрапуклеозидтрифосфата d(MeOTr)T-T-T-T проведен с использованием трехкратного избытка d(MeOTr)Tp и TPS в качестве конденсирующего агента. При экстракции d(MeOTr)T-T-T-T(iBu) смесью *n*-бутанол — хлористый метилен (20:80) отмечено, что выделение проходит более успешно, чем экстракция того же соединения, синтезированного путем наращивания олигонуклеотидной цепи от 5'- к 3'-концу. Удалением метокситритильной группы получен 3'-О-защищенный тетрапуклеозидтрифосфат dT-T-T-T(iBu).

Синтез гексануклеозидпентафосфата d(MeOTr)T-anC-T-T-T-T осуществлен с использованием трехкратного избытка динуклеотида d(MeOTr)T-anCp в присутствии TPS. Защищенный гексануклеотид легко отделяется от избытка динуклеотида экстракцией последнего *n*-бутанолом в хлористом метилене (15:85). Для отделения от тетрапуклеозидтрифосфата была использована хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте бикарбоната триэтиламония.

Синтезированные соединения были охарактеризованы хроматографически и электрофоретически, гомогенность подтверждена хроматографией на микроколонке с ДЭАЭ-целлюлозой в градиенте концентрации NaCl в 7*M* мочеvine при pH 7,5. Структура соединений подтверждена результатами гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (см. табл. 2).

Синтез гексануклеозидпентафосфата был проведен с использованием ионообменной хроматографии лишь на последней стадии выделения соединения, что подтверждает перспективность этого подхода для развития экспресс-метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Y. Agarwal, A. Jamazaki et al., *Angew. Chem.*, v. 84, 489 (1970). ² M. S. Poonian, E. F. Nowoswiat et al., *Bioorg. Chem.*, v. 2, 322 (1973). ³ R. L. Letsinger, M. N. Caruthers et al., *J. Am. Chem. Soc.*, v. 89, 7146 (1967). ⁴ K. Itakura, S. A. Narang, *Canad. J. Chem.*, v. 51, 3649 (1973). ⁵ М. М. Кабачник, В. К. Потанов и др., *ДАН*, т. 201, 858 (1971). ⁶ K. Y. Agarwal, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 94, 3576 (1972). ⁷ R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 91, 3350 (1969). ⁸ В. А. Баканова, Н. Ф. Сергеева и др., *Журн. биоорганич. хим.*, т. 1, № 6, 774 (1975). ⁹ IUPAC, *Europ. J. Biochem.*, v. 15, 203 (1970). ¹⁰ В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре и др., *Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук*, в. 4, № 9, 152 (1974).