



УДК 547.857.7'455.057 : 577.113.6

© 1993 г. М. О. Тактакишвили, М. Х. Карузерс *

ДВА ПОДХОДА К КРУПНОМАСШТАБНОМУ СИНТЕЗУ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДДИТИОАТОВ

*Химический факультет Тбилисского государственного университета им. И. Джавахишвили, Тбилиси;
* Химический факультет университета штата Колорадо, Боулдер, Колорадо*

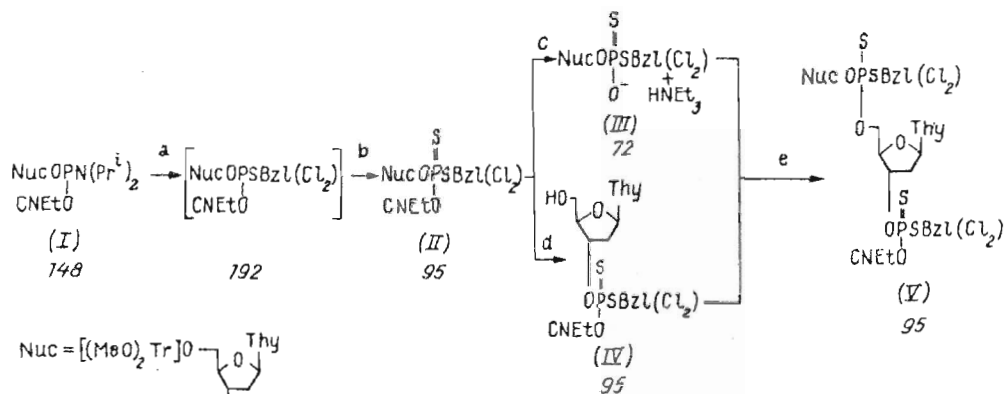
Осуществлен крупномасштабный синтез олиготимидиндидитиоатов. Триэфирным методом синтеза в растворе получены димеры и тетрамеры (в миллимолярных количествах) и октамер (0,1 ммоль). С помощью твердофазного синтеза на ПЭГ в качестве полимера-носителя и с использованием тиаомидитного подхода получены октануклеотиддидитиоаты $T_8(S_2)$ (0,02 ммоль) и $C_7T(S_2)$ (0,12 ммоль). Для олигонуклеотиддидитиоатов, синтезированных твердофазным методом, предложен новый способ очистки, включающий в себя отщепление защищенного олигонуклеотида от носителя, адсорбционную хроматографию на силикагеле, полное деблокирование и обращенно-фазовую хроматографию низкого давления на силикагеле C_{18} .

Развитие методов синтеза олигодезокси- и рибонуклеотидов идет по пути использования двух основных подходов. Во-первых, это сравнительно медленный триэфирный метод синтеза в растворе [1—10], позволяющий синтезировать ДНК в довольно значительных количествах, необходимых для рентгеноструктурного анализа и медико-биологических исследований, особенно клинических испытаний. Во-вторых, это твердофазные методы автоматизированного синтеза для быстрого получения малых количеств олигонуклеотидного материала (порядка 1 ОЕ) для молекулярно-биологических целей. В то время как фосфотриэфирный метод [1—10] практически вышел из употребления, фосфиттриэфирный (амидофосфитный) [11—17] и Н-фосфонатный [18—30] методы олигонуклеотидного синтеза широко используются в практике множества лабораторий.

В последние годы эти методы находят применение в синтезе и биохимических исследованиях искусственных аналогов ДНК, модифицированных по основанию [31—36] или фосфатному остатку [37—39]. В то время как модификации азотистых оснований локализованы во внутренней области ДНК-дуплекса и поэтому стерически не слишком доступны для последующих воздействий, модификации межнуклеотидной фосфодиэфирной связи затрагивают периферическую область дуплекса и открыты для различных реагентов, растворителей, белковых молекул.

Модификация межнуклеотидной связи может служить источником многообразных производных нуклеиновых кислот — фосфотриэфиров [40—43], метилфосфонатов, [44], амидофосфатов [45—49], алкилфосфонотиоатов [50], фосфотиоатов [44, 51, 52], амидофосфотиоатов [50]. Поскольку в этих аналогах атом хирален, они, как правило, представляют собой смесь соответствующего числа диастереомеров. От этого недостатка свободны дитиоаналоги ДНК, в которых два несвязывающих кислорода межнуклеотидного фосфата заменены серой [50, 53—63]. Подобно природной ДНК ее дитиоаналоги ахиральны, сохраняют ионный характер межнуклеотидной связи [37] и устойчивы к химическому гидролизу [60]. В то же время дитиоаты устойчивы и к нуклеазам [53—56]. Они обладают противовирусной активностью [64—67] и могут представлять интерес для лечения злокачественных новообразований [65—67].

Синтез полностью защищенных триэфирных нуклеотидфосфодитиоатов и динуклеотиддитиоатов. Цифры под формулами дают значение химического сдвига в спектре ^{31}P -ЯМР (δ р, м. д.)



a: $\text{Bzl}(\text{Cl}_2)_2\text{SH}$, Tetr, b: S_8 , c: $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_3\text{CN}$, d: $\text{CCl}_3\text{COOH}/\text{Cl}_2\text{CH}_2$, e: TPS-Cl, MeIm.

Дитиоаты довольно легко могут быть подвергнуты функционализации путем окисления в присутствии спиртов или аминов или же прямым алкилированием. Полученные таким образом модифицированные ДНК и РНК, содержащие спиновые метки, маркеры, реакционноспособные группировки, могут использоваться в различных биофизических и биохимических исследованиях.

Упомянутые выше методы синтеза природных олиго- и полинуклеотидов были применены также для получения дитиоаналогов ДНК. В то время как Н-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотиддитиоатов [50, 53] пока находится в стадии разработки, для синтеза малых и больших количеств олигонуклеотиддитиоатов эффективными оказались тиаамидитный [68—73] и фосфотриэфирный [62] методы.

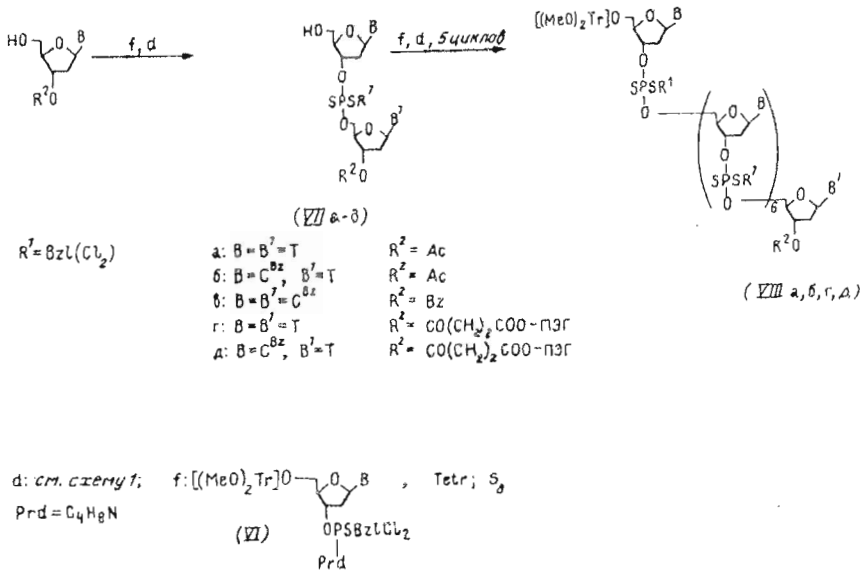
В данной работе оба эти подхода использованы для крупномасштабного синтеза олигонуклеотиддитиоатов.

Фосфотриэфирный синтез в растворе

Крупномасштабный триэфирный синтез олиготимидиндитиоатов (1—2 ммоль ди-, три- и тетрамеров, 0,1 ммоль октамера) был осуществлен исходя из 20 ммоль амидита тимидина (I). Универсальный синтон — полностью защищенный тимидиндитиоат (II) — был синтезирован взаимодействием амидита (I) с 2-кратным количеством дихлорбензилмеркаптана в присутствии 2,5-кратного количества тетразола [62]. Промежуточный фосфиттриэфир — β -цианэтил-S-дихлорбензилтиоит — без выделения был окислен элементарной серой в дитиоат (II) [62], который после обработки реакционной смеси и осаждения гексаном был выделен в виде белого порошка с выходом 95%. Полученный продукт может быть далее использован без хроматографической очистки.

Дегритилирование осуществляли 3% трихлоруксусной кислотой в безводном хлористом метиле [62, 74] с последующей хроматографической очисткой и осаждением гексаном (выход ОН-компонента (IV) 90%). Защитную β -цианэтильную группу удаляли непосредственно перед конденсацией действием на полностью защищенный дитиоат (II) 50% раствора триэтиламина в ацетонитриле [62], полученную триэтиламмониевую соль (III) (выход 80—90%) использовали без дополнительной очистки. Межнуклеотидную конденсацию проводили в ацетонитриле, используя 50% избыток Р-компонента (III) и 3-кратный избыток триизопропилбензолсульфохлорида в качестве конденсирующего реагента [74] (схема 1).

Жидко- и твердофазный синтез олигонуклеотиддитиоатов



Твердофазный тиоамидитный синтез на ПЭГ

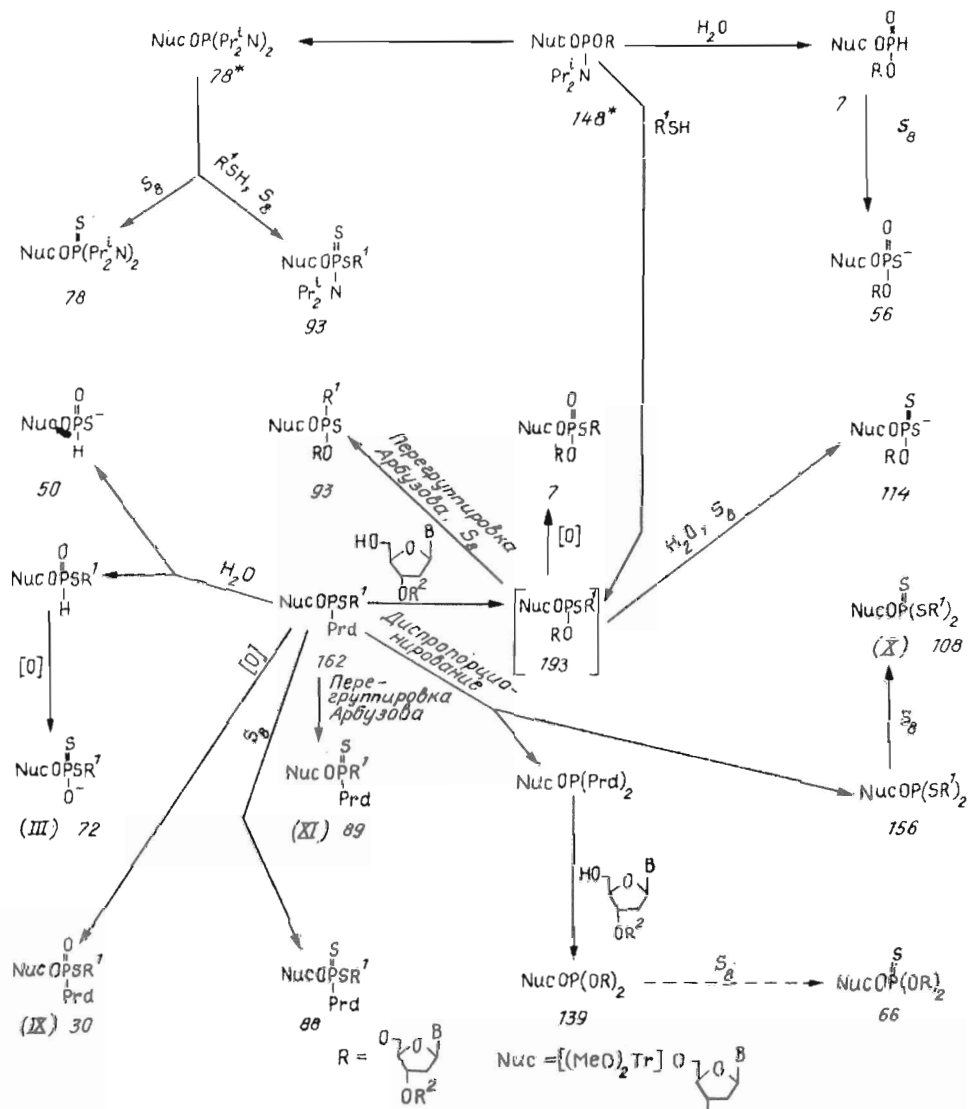
В течение многих лет при твердофазном синтезе олигонуклеотидов [2—20] в качестве носителей использовали исключительно нерастворимые органические и неорганические полимеры. При всех неоспоримых достоинствах этого подхода он требует использования больших избытков реагентов (прежде всего нуклеотидного материала), необходимых для достижения высоких выходов при поэтапном наращивании олигонуклеотидной цепи. Замена нерастворимых носителей на носители, нерастворимые в неполярных, но хорошо растворимые в полярных растворителях (модифицированная целлюлоза [75], ПЭГ [76]), позволяет проводить конденсации в растворе с умеренными избытками Р-компонента и вместе с тем сохраняет одно из наиболее существенных преимуществ твердофазного метода — возможность обойтись без поэтапной хроматографической очистки.

В настоящей работе в качестве второго варианта крупномасштабного синтеза олигонуклеотиддитиоатов был использован «метод твердой жидкой фазы», разработанный для синтеза коротких олигонуклеотидов [76]. В качестве полимера-носителя был избран монометилловый эфир полиэтиленгликоля, цепь наращивали тиоамидитным методом в направлении от 3'- к 5'-концу [68—73]. Этим путем был осуществлен синтез олигонуклеотиддитиоатов $\text{C}_7^{\text{Bz}}\text{T}(\text{S}_2)$ (VIIIб) и $\text{T}_8(\text{S}_2)$ (VIIIа) (схема 2). Для контроля эти же октамеры были синтезированы жидкофазным тиоамидитным методом (схема 2).

Известно, что амидитный синтез олигонуклеотиддитиоатов сопровождается образованием ряда побочных продуктов [13], так что выход целевого продукта не превышает 50—55% [13]. Это обстоятельство побудило нас, прежде чем приступить к тиоамидитному синтезу длинных последовательностей, специально исследовать реакцию смесь, образующуюся при получении димеров (VII) в растворе (схема 2). Вопреки ожиданиям, спектр ^{31}P -ЯМР показал, что исходный тиоамидит (VI), взятый, согласно [13], в 2-кратном избытке, в реакционной смеси отсутствует. Таким образом, учитывая расход тиоамидита на побочные реакции, его следует брать не менее чем в 2,5-кратном избытке*.

* Использование в качестве альтернативы пирролидинфосфотиоамидиту (VI) его N,N-диизопропилного аналога [72] дает худшие результаты (данные не приведены).

Катализируемые тетразолом побочные реакции промежуточных соединений, содержащих трехвалентный фосфор. Обозначения как на схеме 2



Дальнейшее изучение спектров ^{31}P -ЯМР первой и второй стадий реакции (т. е. конденсации мономеров и последующего окисления серой, схема 1) подтвердило, что основным продуктом реакции — целевой динуклеотидфосфодитиоат (др 193 м. д. до окисления и 93 м. д. после окисления). При увеличении чувствительности, однако, дополнительно обнаруживается ряд пиков, соответствующих различным побочным продуктам, образующимся в результате сопутствующих реакций детритилирования, окисления, гидролиза и перегруппировки Арбузова с участием соединения трехвалентного фосфора, крайне нестабильного в присутствии тетразола (катализатора реакций) (схема 3).

При хроматографическом выделении продукта конденсации большинство этих побочных продуктов (III, IX—XI) было получено в индивидуальном виде и охарактеризовано спектрами ^{31}P - и ^1H -ЯМР (см. «Экспериментальную часть»).

В результате контрольного жидкофазного тиаамидитного синтеза октамеров $T_8(S_2)$ (VIIIa) $C_7^{Zr}T(S_2)$ (VIIIб) в масштабе 5 мкмоль было получено 38 и 34 OE_{254} , что отвечает 10% суммарному выходу при 7-стадийном синтезе октамеров.

Функционализацию ПЭГ 5'-диметокситритилтимидин-3'-сукцинатом для тиаамидитного синтеза на ПЭГ осуществили согласно методам [75, 76]. При этом количество иммобилизованного нуклеозида составило 155 мкмоль/г носителя. После кепирования уксусным ангидридом и детритилирования трихлоруксусной кислотой получили ПЭГ с пришитым первым звеном, готовый к сборке олигонуклеотидной цепи.

Новый полимерный носитель был испытан на примере синтеза октануклеотиддитиоата $C_7^{Zr}T(S_2)$ (VIIIб) исходя из 1,2 ммоль иммобилизованного нуклеозида. Элонгацию цепи проводили согласно работам [58, 72, 73], действуя двукратным избытком тиаамидита и трехкратным избытком тетразола. Выход на каждой межнуклеотидной конденсации определяли по величине A_{498} ; наблюдавшиеся в ряде случаев величины $>100\%$, по-видимому, обусловлены не полностью отмытыми тритилсодержащими примесями.

Следует отметить, что по мере наращивания нуклеотидной цепи вес образца ПЭГ-олигонуклеотида, вопреки ожидаемому 5% приросту веса на стадию, не изменялся, вероятно, из-за потерь полимерного материала при осаждении эфиром. Очистку ПЭГ-олигонуклеотида перекристаллизацией из этанола и кепирование после конденсации [76] мы не использовали, полагая их недостаточно эффективными. В самом деле, первое приводило к значительным весовым потерям, а второе — к потемнению образца и трудностям, связанным с последующим удалением пиридина.

Детритилирование $(MeO)_2Tr$ -ПЭГ-олигонуклеотида в отличие от детритилирования $(MeO)_2Tr$ -олигонуклеотида, иммобилизованного на нерастворимой подложке, подавляется избытком высвобождающегося тританола и требует двукратной обработки трихлоруксусной кислотой с осаждением эфиром после каждой обработки для удаления тританола. При подготовке ПЭГ-олигонуклеотида к очередному этапу наращивания цепи важна тщательная отмывка от трихлоруксусной кислоты и элементарной серы; при этом также необходима двукратная обработка реакционной смеси.

Некоторые из способов обработки реакционной смеси, заимствованные из жидкофазного метода, например хроматографическая очистка ПЭГ-олигонуклеотида на силикагеле или удаление трихлоруксусной кислоты экстракцией водным $NaHCO_3$, оказались неэффективными.

Таким образом, с использованием метода [76] был синтезирован октануклеотид $C_7^{Zr}T(S_2)$ -ПЭГ (VIIIд). Спектр ^{31}P -ЯМР неочищенного продукта 7-стадийного синтеза очень сходен со спектром реакционной смеси, получаемой при жидкофазном синтезе динуклеотидфосфоридитиоатов (см. выше), однако в спектре октамера пики значительно шире.

Основной пик поглощения в области 93—96 м. д. (44,5%) соответствует дитиоатной фракции нуклеотидного материала. Присутствуют также пики (25,5%) продуктов ряда побочных реакций: окисления (триэфирный монотиоат при 26 м. д., 0,5%), гидролиза с последующим окислением кислородом (диэфирный монотиоат при 56 м. д., 5,5%) или серой (диэфирный дитиоат при 113—116 м. д., 15%). Помимо этих примесей образец, по данным спектра, содержит также ряд растворимых, но не отмываемых эфиром примесей — продукты окисления тиаамидита кислорода (30—31 м. д., 9%) и другие (20%). В результате очистки порции вещества двукратной перекристаллизацией из этанола (при этом теряется 40% полимерного материала) количество растворимых примесей удалось существенно снизить.

Наконец, мы провели синтез октамера $T_8(S_2)$ (VIIIг) (в масштабе 0,1 ммоль), используя 3-кратный избыток тиаамидита. Согласно спектру ^{31}P -ЯМР неочищенного октамера (VIIIг), процентное соотношение продуктов в смеси в этом

случае изменяется в пользу дитиоата (фракции, содержащей целевой октамер): дитиоат — 58,5%, побочные продукты — 27,5%, растворимые примеси — 13,5%. По всей вероятности, такое соотношение отражает реальный предел возможностей тиаомидитного метода синтеза олигонуклеотиддитиоатов на ПЭГ.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{31}P -ЯМР снимали на ЯМР-спектрометрах Varian Gemini 300 (300 МГц) и Jeol 90 QX (90 МГц) в CDCl_3 ; хим. сдвиги приведены в миллионных долях относительно CHCl_3 (внутренний стандарт, ^1H -ЯМР) или H_3PO_4 (внешний стандарт, ^{31}P -ЯМР). ТСХ проводили на пластинках с алюминиевой подложкой марки Silika gel 60 F254, 0,2 мм (Merck) в системах ацетон — этилацетат — вода, 10 : 5 : 1 (А) и 10% метанол в хлористом метиле (Б). Для колоночной хроматографии использовали кизельгель марки MN-Kieselgel 60 ASTM (Macherey and Nagel), элюируя градиентом метанола в хлористом метиле, или силикагель марки Silika gel 100 C18 — reverse phase (Fluka), элюируя градиентом ацетонитрила в воде. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе 345/345В (Waters).

Без предварительной очистки и осушки использовали следующие реагенты и растворители: монометиловый эфир полиэтиленгликоля PEG 5000 (Fluka), серу сублимированную (Merck), диэтиловый эфир безводный (Mallinkrodt), 2,4-дихлорбензилмеркаптан (Lankaster Synthesis), 1-Н-тетразол сублимированный (Teir), пирролидин (99%), дициклогексилкарбодиимид (DCC), 4-диметиламинопиридин (DMAP) (99%), 4-тиофенол (99%), сероуглерод безводный (все реагенты от фирмы Aldrich), ацетонитрил для обращенно-фазовой хроматографии (HPLC-grade, Baker Analised), воду для обращенно-фазовой хроматографии (BJ Brand High Purity, Burdok, Jackson). Триэтиламин (99%, Aldrich) для ТЕАВ-буфера перегоняли перед использованием. Хлористый метилен, ацетонитрил, пиридин и THF перегоняли над гидридом кальция и дегазировали пропусканием аргона. Использовали 5'-диметокситритилтимидин и N-бензоил-5'-диметокситритилцитидин (Aldrich). 5'-Диметокситритилтимидин-3'-О-сукцинат и О'-(5'-диметокситритилтимидин-3'-ил)-О-(β-цианэтил)-N,N-диизопропилфосфамидит (I) получали как описано в работе [76]. О-(5'-О-Диметокситритилнуклеозид-3'-ил)-S-(2,4-дихлорбензил)-N,N-диизопропилфосфотиоамидит и пирролидинфосфотиоамидит (VI) синтезировали согласно работе [72].

Полностью защищенный триэфирный синтон (моноклеотидфосфодитиоат)-О-(5'-диметокситритилтимидин-3'-ил)-О-(β-цианэтил)-S-(2,4-дихлорбензил) фосфодитиоат (II). 386 мг (2 ммоль) 2,4-дихлорбензилмеркаптана и 175 мг (2,5 ммоль) тетразола в виде раствора в минимальном объеме ацетонитрила приливали к раствору 745 мг (1 ммоль) амидита (I) в 5 мл ацетонитрила. Через 1—2 мин выпадает обильный осадок диизопропиламиногидротетразолида. Через 40 мин добавляли 50 мл (10-кратный избыток) 0,2 М раствора серы в смеси толуол — 2,6-лутидин (19 : 1) и перемешивали 1 ч. Реакционную смесь растворяли в 100 мл этилацетата, промывали водным раствором NaHCO_3 и NaCl (по 100 мл), упаривали, доупаривали со спиртом или толуолом и хроматографировали на колонке со 100 мл силикагеля, элюируя 2—3% раствором метанола в хлористом метиле. Выход 790 мг (90%).

Децианэтилизирование дитиоата (II) проводили согласно методике [62]. Получали О-(5'-О-диметокситритилтимидин-3'-ил)-S-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоат (III), по хроматографическим и спектральным данным идентичный описанному [62].

Детритилирование дитиоата (II) [62, 74] привело к О-(тимидин-3'-ил)-О-(β-цианэтил)-S-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоату (IV), R_f 0,45 (Б), ^{31}P -ЯМР: δ_P 94,286; ^1H -ЯМР: δ_H 10,098 (с, 1H, HN-3), 7,495 (с, 1H, H-6), 7,374—7,168 (3H, H ароматич.), 6,157 (т, J 6,75 Гц, 1H, H-1'), 5,227 (1H, H-3'), 4,226—4,048

(1 + 2 × 2H, H-4', SCH₂, POCH₂), 3,801 (уш. с, 2H, H-5'), 2,717 (т, J 4,95 Гц, 2H, CH₂CN), 2,386—2,332 (2H, H-2'), 1,810 (с, 3H, CH₃).

Триэфирная конденсация, получение O-[[O-3'-S-(2,4-дихлорбензил)-O-(β-цианэтил)тиофосфо]тимидин-5'-ил]-O-(5'-диметокситритилтимидин-3'-ил)-S-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоата (V). 1,32 г (1,5 ммоль) соединения (II) растворяли в 10 мл смеси триэтиламин — ацетонитрил и через 2 ч (ТСХ-контроль полноты удаления β-цианэтильной группы) смесь упаривали. К полученному в виде триэтиламмониевой соли Р-компоненту (III) добавляли 575 мг (1 ммоль) ОН-компонента (IV) и смесь обезвоживали 2-кратным упариванием с ацетонитрилом, затем добавляли 900 мг (3 ммоль) 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида (TPS-Cl) и 500 мг (6 ммоль) N-метилимидазола (MeIm) и растворяли в минимальном объеме ацетонитрила или THF. Через 2 ч (ТСХ-контроль на отсутствие ОН-компонента) добавляли равный объем 50% водного пиридина и через 15 мин реакционную смесь обрабатывали как в случае получения триэфирного мономера (II). Продукт (V) очищали колоночной хроматографией, элюируя 3% раствором метанола в хлороформе или хлористом метиле. Выход 790 мг (90%), R_f 0,68 (система Б). После детритилирования R_f 0,65 (система Б). δ_р 97,020, 95,500; δ_н 10,210 и 10,118 (2 × с, 2 × 1H, HN-3), 7,737 и 7,519 (2 × с, 2 × 1H, 6-H), 7,6—7,0 (2 × 3H, H ароматич.), 6,317 и 6,260 (2 × т, J 1,5 Гц, 2 × 1H, H-1'), 5,250 (2 × т, J 5 Гц, 2 × 1H, H-3'), 4,200 (2 × 2H, H-4' и POCH₂-5'), 4,170 (2 × 2H, SCH₂, POCH₂), 3,917 (2H, HOCH₂-5'), 2,777 (т, J 5 Гц, 2H, CH₂CN), 2,400—2,350 (м, 2 × 2H, H-2'), 2,011 и 1,964 (2 × с, 2 × 3H, CH₃-5).

Аналогично димеру (V) синтезировали 3'-концевой димер (VIIa) (95%). Цепь наращивали, используя (V) как Р-компонент. Выход тримеров и тетрамеров составляет 85—90%. Данные для тринуклеотидов и более длинных последовательностей здесь и в дальнейшем (для продуктов тиоамидитных конденсаций) не приводятся.

Тиоамидитная конденсация (наращивание олигонуклеотидной цепи при тиоамидитном синтезе в растворе или на ПЭГ в качестве полимера-носителя). ОН-Компонент реакции конденсации (3'-защищенный нуклеозид, олигонуклеотиддитиоат или ПЭГ-олигонуклеотиддитиоат) обезвоживали упариванием с ацетонитрилом. Добавляли 6 мл 0,5 ацетонитрильного раствора тетразола и смесь упаривали досуха. Отдельно в минимальном объеме ацетонитрила растворяли Р-компонент (тиоамидит (VI)) — 2 ммоль для жидкофазного или 3 ммоль для твердофазного синтеза — и сразу приливали к сухому остатку. Реакционную смесь перемешивали до полного растворения ОН-компонента и катализатора и, для завершения реакции, еще 3 мин (синтез в растворе) или 5 мин (твердофазный синтез). Именно такая последовательность смешения реагентов обеспечивает постоянный многократный избыток тиоамидита в реакционной смеси.

Добавляли равный объем насыщенного раствора серы в смеси сероуглерод — пиридин (9 : 1) и оставляли на ночь. Затем реакционную смесь обрабатывали как описано ранее [58, 72]: упаривали, добавляли этилацетат, отфильтровывали выпавшую серу, раствор промывали водным NaHCO₃ и NaCl, упаривали и остаток хроматографировали. Выход тритильных димеров (VII) составил 60—65% (50—60% для более длинных последовательностей). После детритилирования соединения повторно хроматографировали.

При твердофазном синтезе избыток серы не может быть удален в один прием, поскольку при полном удалении растворителя смесь довольно сильно темнеет. Поэтому реакционную смесь отфильтровывали от осадка серы, осаждали 10—15-кратным объемом безводного холодного эфира [76], растворяли в этилацетате, отфильтровывали оставшуюся серу, снова осаждали эфиром и высушивали в вакууме. В результате, по данным ТСХ, получили практически чистый продукт (при опрыскивании кислотой пятно окрашивается в оранжевый цвет) с выходом 95% (по весу).

Детритилировали действием 5-кратного избытка 3% раствора трихлоруксусной кислоты в безводном хлористом метиле 15 мин при 0° С [76]. Продукты

жидкофазного синтеза после обработки трихлоруксусной кислотой выделяли как описано в работе [62]. При детритилировании ПЭГ-олигонуклеотида проводили осаждение эфиром, осадок растворяли в безводном хлористом метиле и повторно детритилировали; после осаждения осадок тщательно отмывали от трихлоруксусной кислоты и тританола до обесцвечивания фильтрата и осадка. Получали практически чистый продукт реакции, при ТСХ R_f 0,0 (система А), 0,3 (система Б) (величина R_f не зависит от длины олигонуклеотидной цепи); при опрыскивании кислотой пятно не окрашивается, но дает сине-коричневое окрашивание при обработке 2% раствором фенола и конц. H_2SO_4 в спирте.

O-(3'-Ацетилтимидин-5'-ил)-*O*-(тимидин-3'-ил)-*S*-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоат (VIIa). Выход 60%, R_f 0,45 (система Б). δ_r 96,709, 95,565; δ_H 10,147 и 10,068 (2×с, 2×1H; HN-3), 7,514 и 7,364 (2×с, 2×1H, 6H), 7,331—7,163 (3H, H ароматич.), 6,276 и 6,267 (2×т, 1,5 Гц, 2×1H, H-1'), 5,245 (т, J 5,5 Гц, 1H, H-3') и 4,990 (д, J 25 Гц, 1H, H-3'), 4,202 (2×2H, H-4' и $POCH_2-5'$), 4,148 (2H, SCH_2), 3,828 (2H, $NOCH_2-5'$), 2,361—2,350 (уш. с, 2×2H, H-2'), 2,065 (с, 3H, CH_3CO), 1,875 и 1,814 (2×с, 2×3H, CH_3-5').

O-(3'-Ацетилтимидин-5'-ил)-*O*-(*N*-4-бензоилцитидин-3'-ил)-*S*-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоат (VIIб). Выход 60%, R_f 0,45 (Б). δ_r 95,40, 93,95; δ_H 7,60 (с, 2×1H, H-6, T), 7,41 и 7,16 (2×д, J 4 Гц, 2×1H, H-5 и H-6, C^{Bz}), 7,38—7,19 (8H, H ароматич.), 6,29 и 6,19 (2 кв, J 10 Гц; 8 Гц, 2×1H, H-1'), 5,28 (т, J 8 Гц, 1H, HN-3') и 5,04 (2×д, 1J 25 Гц, 2J 8 Гц, 1H, H-3'), 4,22 (с, 2H, CH_2), 4,18—4,11 (2×2H, H-4' и $POCH_2-5'$), 3,83 (2H, $NOCH_2-5'$), 2,57 и 2,35 (2×м, 2×2H, H-2'), 1,88 (с, 3H, CH_3CO), 1,83 (с, 3H, CH_3-5'). Примесь — 5% триэтиламина: 2,65 (кв, J 10 Гц, 2H, NCH_2), 0,84 (т, J 10 Гц, 3H, CH_3).

O-(*N*-4-*O*-3'-Дибензоилцитидин-5'-ил)-*O*-(*N*-4-бензоилцитидин-3'-ил)-*S*-(2,4-дихлорбензил)фосфодитиоат (VIIв). Выход 50%, R_f 0,5 (Б), δ_r 95,64, 94,37; δ_H 10,23 (с, 2×1H, CONH), 7,49 и 7,20 (2×д, 2×2H, H-5 и H-6), 7,33 и 7,03 (18H, H ароматич.), 6,27 и 6,17 (2×т, J 7 Гц, 2×1H, H-1'), 5,23 и 5,10 (2×1H, H-3'), 4,27 (с, 2H, SCH_2), 4,22—4,13 (2×2H, H-4' и $POCH_2-5'$), 3,45 (2H, $NOCH_2-5'$), 2,55—2,35 (2×2H, H-2').

При хроматографии продуктов детритилирования реакционной смеси межнуклеотидной конденсации выделили побочные продукты (IXб)—(XIб).

O-(*N*-4-Бензоилцитидин)-*S*-(2,4-дихлорбензил)пирролидинфосфодитиоат (IXб). Следовые количества. R_f 0,55 (Б), δ_r 31,69, 31,496; δ_H 8,47 и 7,08 (2×д, 2×1H, H-5 и H-6), 7,85 (д, 2H, H-1 и H-6 Bz), 7,39 (2H, H-3 и H-5 Bz), 7,51—7,30 (4H, H ароматич.), 6,23 (т, 1H, H-1'), 5,23 (уш. с, 1H, H-3'), 4,24 (д, 1H, H-4'), 3,98 (2H, SCH_2), 3,88 (уш. с, 2H, H-5'), 3,05 (уш. с, 4H, NCH_2 пирролидина), 2,67 и 2,28 (2м, 2H, H-2'), 1,34 (т, 4H, NCH_2CH_2 пирролидина).

O-(*N*-4-Бензоилцитидин-3'-ил)-бис-*S*-(2,4-дихлорбензил)фосфотритиоат (Xб). R_f 0,7 (Б), δ_r 109,563; δ_H 8,36 и 6,83 (2×д, J 10 Гц, 2×1H, H-5 и H-6), 7,91 (д, J 10 Гц, 2H, H-2 и H-6 Bz), 1,44 (т, J 10 Гц, 2H, H-3 и H-5 Bz), 7,52—7,15 (7H, H ароматич.), 6,18 (т, J 8 Гц, 1H, H-1'), 5,37 (2×д, 1J 15 Гц, 2J 5 Гц, 1H, H-3'), 4,28 (уш. с, 1H, H-4'), 4,10 и 4,05 (2×с, 2×2H, SCH_2), 3,88 (кв, J 10 Гц, 2H, H-5'), 2,65 и 2,30 (2×м, 2×H, H-2'). Примеси — 2—3% пирролидина и триэтиламина.

Трипирролидинфосфотиоат Prd_3PS . Следовые количества. R_f 0,75 (Б), δ_r 64,472; δ_H 3,954—3,751 (кв, J 6,3 Гц, 4H, NCH_2), 2,143—2,081 и 2,019—1,956 (2×кв, $J_{2,3}$ 18 Гц, $J_{2,1}$ 6,3 Гц, 4H, NCH_2CH_2).

O-(*N*-4-Бензоилцитидин-3'-ил)-2,4-дихлорбензил-пирролидинфосфотиоат (XIб) (продукт перегруппировки Арбузова) [72]. R_f 0,65 (Б), δ_r 89,979.

Деблокирование $(MeO)_2Tr$ -октануклеотиддитиоатов, синтезированных жидкофазным методом, осуществляли согласно работе [73].

Отщепление $(MeO)_2Tr$ -олигонуклеотиддитиоатов от полимера-носителя. После заключительной конденсации ПЭГ-олигонуклеотиддитиоаты (VIIIг, д) от-

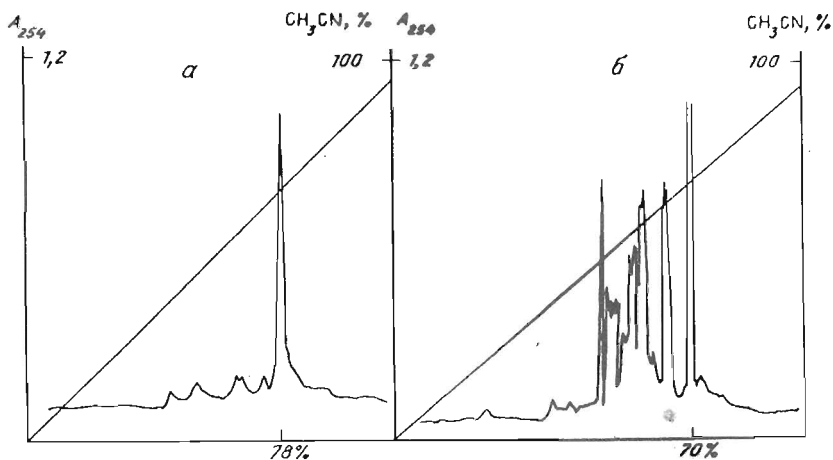


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ октамеров $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T_8(\text{S}_2)$ (а), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]C_7T(\text{S}_2)$ (б) на колонке Partisil Pxs 10/25 PAC C_{18} Wathman в градиенте концентрации ацетонитрила (0—95%) в 0,1 М ацетате триэтиламмония, pH 7,5. На оси абсцисс отмечена выделяемая фракция

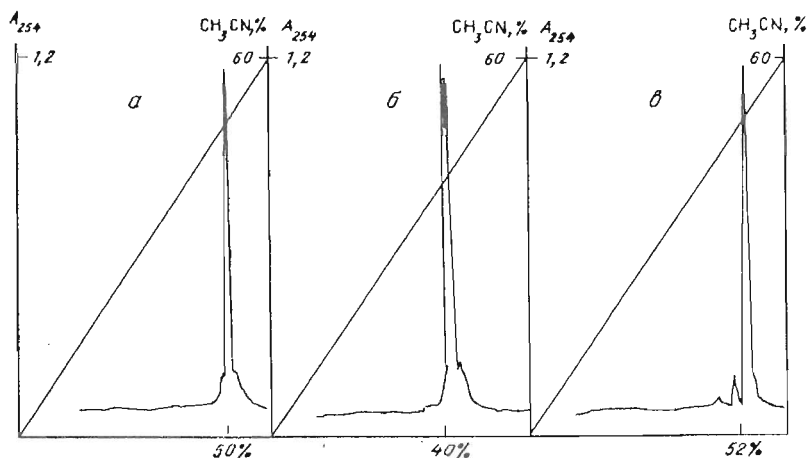


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ октамеров после препаративной хроматографической очистки $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T_8(\text{S}_2)$ (а), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]C_7T(\text{S}_2)$ (б) и $\text{HOT}_8(\text{S}_2)$ (в) на той же колонке в градиенте концентрации ацетонитрила (0—60%) в 0,1 М ацетате триэтиламмония

щепляли от ПЭГ-носителя, не затрагивая N-бензоильных групп гетероциклических оснований и S-дихлорбензильных групп межнуклеотидных фосфатов олигонуклеотида. Для этого их перемешивали при 0°C с 3-кратным избытком 1 М водно-спиртового NaOH. Через 10 мин анализ ТСХ показал, что $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -содержащее пятно олигонуклеотиддитиоата (R_f 0,0 (А)) переходит в новое пятно с R_f 0,3—0,4, соответствующее незащищенному олигонуклеотиддитиоату. Пятно ПЭГ при этом остается на старте и уже не окрашивается в оранжевый цвет при опрыскивании кислотой.

Избыток NaOH осторожно, чтобы не затронуть $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -группы, нейтрализовали уксусной кислотой и без дальнейшей обработки хроматографировали на колонке с силикагелем. Целевой продукт элюировали 8—10% раствором метанола в хлористом метиле, выделили следующие количества октамеров: $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T_8(\text{S}_2)^*$

* Межнуклеотидный тиофосфат защищен S-дихлорбензильной группой.

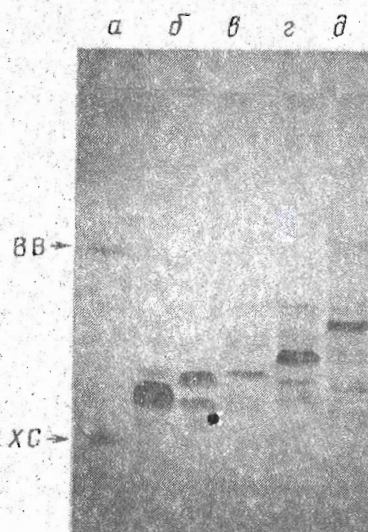


Рис. 3. Электрофорез в 20% ПААГ октамеров $\text{HOT}_8(\text{S}_2)$ (а), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_8(\text{S}_2)$ (б); нанесены также контрольные образцы $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{10}(\text{S}_2)$ (в), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{\text{Nuc}_{10}}(\text{S}_2)$ (г), $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{16}(\text{S}_2)$ (д). ВВ — бромфеноловый синий, ХС — ксиленцианол

(синтез в масштабе 0,1 ммоль) — 48,5 мг (0,0095 ммоль) (сквозной выход 19%); $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_8\text{C}^{\text{Bz}}\text{T}(\text{S}_2)^*$ (синтез в масштабе 1,2 ммоль) — 512 мг (0,12 ммоль) (сквозной выход 10%).

Удаление *S*-дихлорбензильной и *N*-бензоильной групп [73]. Октануклеотидитиоаты растворяли в 10-кратном объеме смеси тиофенол — триэтиламин — диоксан (1 : 2 : 2), через 2 ч осаждали гексаном, центрифугировали и вновь осаждали гексаном для наиболее полного удаления тиофенола.

$[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_8\text{C}^{\text{Bz}}\text{T}(\text{S}_2)$ после тиофенольной обработки растворяли в 10-кратном объеме конц. водного NH_3 (29%, $d = 0,88$) и выдерживали 6 ч при 55° С.

Содержание целевого $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -олигонуклеотидитиоата в неочищенном образце после удаления всех остальных защитных групп оценивали, используя ВЭЖХ на обращенной фазе C_{18} (рис. 1). Образцы веществ диметокситригипроизводных (VIIIа, б) в количестве по 100 OE_{254} очищали препаративной обращенно-фазовой хроматографией. Октамер растворяли в 0,1 М ТЕАВ, наносили на колонку с 10 г силикагеля и элюировали ступенчатым градиентом концентрации ацетонитрила (0—60%) в 0,1 М ТЕАВ. (Для регенерации колонку промывали 5-кратным объемом ацетонитрила) (рис. 2).

Образцы детритилировали, обрабатывая 80% водной уксусной кислотой 30 мин. Упаривали досуха, нейтрализовали водным NH_3 , дважды экстрагировали эфиром и подвергали повторной хроматографической очистке обращенно-фазовой хроматографией (рис. 2). Таким же образом, используя большие загрузки, в один прием можно очищать до 0,1 ммоль олигонуклеотидитиоатов.

Гомогенность полученных дитиоатов — как до, так и после детритилирования — дополнительно контролировали электрофорезом в 20% ПААГ (рис. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfeleiderer W., Schwarz M., Schirmeister H.//Chem. Ser. 1986. V. 26. P. 147—154.
2. Gait M. J.//Oligonucleotide Synthesis, a Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1984. P. 75—77.
3. Matsuzaki J., Hotoda H., Sekine M., Hata T.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 48. P. 5645—5648.
4. Hotoda H., Wada T., Sekine M., Hata T.//Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 14. P. 1681—1684.
5. Kamaike K., Hasegawa Y., Ishido Y.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 6. P. 647—650.
6. Sproat B. S., Rider P., Beijer B.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 4. P. 1811—1823.
7. Sekine M., Hata T.//J. Org. Chem. 1987. V. 52. № 3. P. 946—951.
8. Tanaka T., Orita M., Uesugi S., Ikehara M.//Tetrahedron. 1988. V. 44. № 14. P. 4133—4138.
9. Pochet S., Huynh-Dinh T., Igolet J.//Tetrahedron. 1987. V. 43. № 15. P. 3481—3490.

10. Sproat B. S., Brown D.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 13. № 8. P. 2979—2987.
11. Barone A. D., Tang J. Y., Caruthers M. H.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
12. Nielson J., Marugg J. E., van Boom J. H., Honnens J., Taagaard M., Dahl O.//J. Chem. Res. 1986. P. 26—34.
13. Beaucage S. L., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 15. P. 1859—1862.
14. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 14. P. 6265—6269.
15. Caruthers M. H., Dellinger D., Prosser K., Barone A. D., Dubendoff J. W., Kiercek R., Rosendahl M.//Chem. Ser. 1986. V. 26. P. 25—30.
16. Tanaka T., Fujino T., Tamatsukuri S., Ikehara M.//Chem. Pharm. Bull. 1986. V. 34. P. 4126—4135.
17. Smith L. M., Kaiser K. J., Sanders S. Z., Hood L. E.//Meth. Enzym., Recombinant DNA. Part F. V. 155/Eds R. Wu. N. Y., 1987. P. 260—301.
18. Marugg J. E., Tromr M., Kuyl-Yeheskiely E., Vandermartel G. A., van Boom J. H.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.
19. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 36. P. 4051—4054., *ibid.* № 1. P. 55—59.
20. Froehler B. C., Matteucci M. D.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 5. P. 469—472.
21. Andrus A., Efcavitch J. W., McBride L. J., Giusti B.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 8. P. 861—864.
22. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 12. P. 5399—5407.
23. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R.//Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655—662.
24. De Vroom E., Spierenburg M. L., Dreef C. E., van der Martel G. A., van Boom J. H.//Recueil trav. chim. Pays-Bas. 1987. V. 106. P. 65—66.
25. Eadie I. S., Davidson D. S.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 8333—8349.
26. Sekine M., Narui S., Hata T.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 9. P. 1037—1040.
27. Garegg P. J., Stawinski J., Stromberg R.//Org. Chem. 1987. V. 52. № 1. P. 284—288.
28. Wada T., Hotoda H., Sekine M., Hata T.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 33. P. 4143—4146.
29. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 16. P. 7235—7248.
30. Gaffney B. L., Jones R. A.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 22. P. 2619—2622.
31. Jiriony J., Wood S. G., Ubasawa A.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6579—6590.
32. Ono A., Ueda T.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3855—3878.
33. Ono A., Ueda T.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 1. P. 219—232.
34. De Clercq E.//Anticancer Res. 1986. V. 6. P. 549—556.
35. McClarin J. A., Frederick C. A., Wang Bi-Cheng, Green P.//Science. 1986. V. 234. P. 1526—1541.
36. Seela F., Kehne A. //Biochemistry. 1987. V. 28. № 8. P. 2232—2238.
37. Caruthers M. H.//Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression. Topics in Molecular and Structural Biology. V. 12/Ed. J. S. Cohen. L.: MacMillan Press, 1989. P. 7—24.
38. Nielsen J., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 17. P. 6275—6279.
39. Eritja R., Smirnov V., Caruthers M. H.//Tetrahedron. 1990. V. 46. № 3. P. 721—725.
40. Miller P. S., Chandarsegaran S., Dru D., Pulford S. W., Kan L. S.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 22. P. 5468—5472.
41. Stec W. J., Egan W., Byrd R. A., Phillips L. R., Gallo K. A.//J. Org Chem. 1985. V. 50. № 11. P. 3908—3912.
42. Letsinger R. L., Bach S. A., Eadie J. S.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 14. P. 3487—3490.
43. Letsinger R. L., Proc R. A.//Welch Found. Chem. Res. 1985. V. 29. P. 459—462.
44. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reedy M. P., Ts'o P. O.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6268—6273.
45. Nemer M. J., Ogilvie K. K.//Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 38. P. 4144—4149.
46. Koziolkiewicz M., Uznanski B., Stec W. J., Zon G.//Chem. scr. 1986. V. 26. P. 251—253.
47. Froehler B. C.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 49. P. 5565—5571.
48. Jäger A., Levy M. J., Hecht S. A.//Biochemistry. 1988. V. 27. № 38. P. 7237—7240.
49. Letsinger R. L., Singman C. N., Histan G., Salunkhe M.//J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 13. P. 4470—4472.
50. Brill W. K., Yau E. K., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 48. P. 6621—6627.
51. Eckstein F.//Tetrahedron Lett. 1967. V. 7. № 11. P. 1157—1161.
52. Stec W. J., Zon G., Egan W., Stec B.//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 19. P. 6077—6080.
53. Nielsen J., Brill W. K., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 27. P. 2991—2995.
54. Brill W. K., Nielsen J., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 27. P. 5517—5522.
55. Grandas A., Marshall W., Nielsen J., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 5. P. 543—545.
56. Farschtschi N., Gorenstein D. G.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 65. P. 6843—6845.
57. Stawinski J., Thelin M., Zain R.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 19. P. 2157—2159.
58. Dahl B. H., Bjergarde K., Sommer V. B., Dahl O.//Acta chem. scand. 1989. V. 43. P. 896—992.
59. Dahl B. H., Bjergarde K., Sommer V. B., Dahl O.//Nucleosides and Nucleotides. 1989. V. 8. № 9. P. 1023—1025.
60. Porritt G. M., Reese C. B.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 42. P. 4713—4715.
61. Porritt G. M., Reese C. B.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 10. P. 1319—1322.
62. Yau E. K., Ma Y. X., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 14. P. 1953—1956.
63. Dahl B. H., Bjergarde K., Nielsen J., Dahl O.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 25. P. 3489—3491.
64. Stein C. A., Cohen J. S.//Cancer Res. 1988. V. 48. P. 2659—2663.

65. Zamecnic P. C., Goodchild J., Taguchi Y., Sarian P. S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4143—4148.
66. Smitch C. C., Aurelian L., Reedy M. P., Miller P. S., Ts'o P. O.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2787—2791.
67. Mataukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Broder S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7706—7711.
68. Marugg J. E., Buric A., Tromp M., van der Marel G. A., van Boom J. H.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 21. P. 2271—2273.
69. Farschtschi N., Gorenstein D. G.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 62. P. 6843—6846.
70. Brill W. K., Tang J. Y., Ma Y. X., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 21. P. 2321—2324.
71. Farrance U. K., Eadie J. S., Ivarie R.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 4. P. 1231—1237.
72. Brill W. K., Nielsen J., Caruthers M. H.//Unpublished Results.
73. Beaton G., Dellinger D., Marshall W. S., Caruthers M. H.//Unpublished Results.
74. Sproat B. C., Gait M. J.//Oligonucleotide Synthesis, a Practical Approach/Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 83—115.
75. Kamaike K., Hasegawa Y., Ishido Y.//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 5. P. 647—650.
76. Bonora G. M., Scremin C. L., Colonna F. P., Garbesi A.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 11. P. 3155—3159.

Поступила в редакцию
28.VIII.1991
После доработки
16.VI.1992

*M. O. Taktakishvili, M. H. Caruthers **

TWO APPROACHES TO THE LARGE-SCALE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE DITHIOATES

Department of Chemistry, I.Dzhavakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia;

**Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado at Boulder, Boulder, USA*

The large scale synthesis of oligothymidine dithioates have been carried out. Using the triester liquid-phase approach, high purity fully protected dimer — tetramer dithioate blocks (in mmolar amounts) and octamer dithioate (in 0.1 mmol amount) have been obtained. Large scale solid-phase synthesis, using thioamidite approach and polyethyleneglycol monomethyl ether as support, have been carried out to give 0.02 and 0.12 mmolar amounts of octamer dithioates T₈(S₂) and C₇T(S₂). A new method of purification for the oligonucleotide dithioates, synthesised by the solid phase approach, has been introduced; it includes the cleavage of the protected oligonucleotide from the polymer support, adsorbition chromatography on silica gel, total deprotection and low-pressure reverse-phase chromatography on silica gel C₁₈.