

2

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. М. М. ШЕМЯКИНА и Ю. А. ОВЧИННИКОВА

D

На правах рукописи

УДК 577.113.6

КОРШУН Владимир Аркадьевич

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА
НЕРАДИОАКТИВНО 5'-МЕЧЕННЫХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

02.00.10 — Биоорганическая химия, химия природных
и физиологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 1993

КОНТРОЛЬНЫЙ
ЭКЗЕМПЛЯР

16.36.487
Работа выполнена в группе генетической инженерии и биотехнологии
Института биоорганической химии им. П.Л. Чебышева ЛННБ України ім.В.Стефаніка
РАН



Научный руководитель:

доктор химический наук профессор
Белая Е.А.
00760701 (L)

Официальные оппоненты: доктор химических наук Потапов В.К.

канд. химических наук Друца В.Л.

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии
им. В.А.Энгельгардта РАН

Защита состоится "___" _____ 1993 г.
в ___ часов на заседании специализированного совета Д 002.35.01
при Институте биоорганической химии им. М.М.Шемякина и
Е.А.Овчинникова РАН по адресу:
117871 ГСП-7, Москва-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Е.А.Овчинникова РАН.

Автореферат разослан "___" _____ 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат химических наук

В.А.Несмеянов

Актуальность темы. В настоящее время наряду с относительно дешевыми и чувствительными изотопными методами мечения биомолекул все более широкое применение находит нерадиоактивное мечение. Разработаны различные неизотопные метки, основными достоинствами которых являются большая экологическая безопасность и практически неограниченный срок хранения. Нерадиоактивно меченные олигонуклеотиды используются в анализе хромосомных дефектов и диагностике молекулярных патологий. Кроме того, нерадиоактивно меченные олигонуклеотиды находят применение в стандартных молекулярно-биологических методах и почти везде могут заменить олигонуклеотиды с изотопной меткой. Например, флуоресцентное мечение лежит в основе методов автоматизированного секвенирования, которые, по мере совершенствования, позволят настолько увеличить скорость извлечения наследственной информации, что станет возможным решение масштабных проблем, подобных расшифровке первичной структуры генома человека.

С нерадиоактивными метками связаны перспективы автоматизации зондодиагностики. Важной проблемой является поиск эффективной системы прямой детекции гибридизации зондов в растворе. Один из подходов состоит в использовании присоединенных к олигонуклеотиду флуоресцентных меток, чувствительных к микроокружению. Такие зонды позволяют количественно определять нуклеиновые кислоты не только с помощью экспрессного гомогенного анализа, но даже непосредственно в живой клетке.

Широкому применению нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов препятствует громоздкость и дороговизна их синтеза. Некоторые зарубежные фирмы производят очень дорогие патентованные реагенты для получения нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов. В нашей стране подобные реагенты не производятся.

Цель работы. Настоящая диссертация посвящена разработке, синтезу и изучению свойств реагентов для введения в олигонуклеотиды флуоресцентной (пиреновой) и аффинной (биотиновой) меток, а также разветвляющих реагентов, позволяющих проводить множественное концевое мечение олигонуклеотидов.

Научная новизна и практическая значимость. В работе предложены новые эффективные реагенты для автоматизированного синтеза нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов. Набор из нескольких реагентов позволяет в автоматическом режиме синтезировать большие серии



конъюгатов олигонуклеотид-метка с различной структурой. Впервые синтезированы олигонуклеотиды, модифицированные большим числом остатков пирена.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международном симпозиуме "Синтетические олигонуклеотиды: проблемы и границы практического использования" (Москва, 1991), на 18-ом симпозиуме по химии нуклеиновых кислот (Сендай, 1991), на международном симпозиуме по нуклеиновым кислотам и мембранам в честь Х. Г. Кораны (Ванкувер, 1993).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы, включающего работ. Работа изложена на страницах, содержит 4 рисунка и 2 таблицы.

В первой главе обобщены и критически рассмотрены имеющиеся в литературе данные по методам синтеза олигонуклеотидов с реакционно-способными функциональными группами и с репортерными группами.

Вторая глава посвящена обсуждению полученных в диссертации результатов по разработке и применению новых реагентов для синтеза нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов.

В третьей главе содержатся сведения о реактивах, материалах, оборудовании и методиках, использованных в диссертационной работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящей работе предлагается набор новых реагентов, позволяющих получать олигонуклеотиды, меченные биотином и пиреном, в том числе содержащие большое число репортерных групп.

Нерадиоактивно меченные олигонуклеотиды находят все более широкое применение в стандартных молекулярно-биологических методах и медицинской диагностике. Наиболее эффективны методы получения таких олигонуклеотидов с использованием модифицирующих реагентов в автоматических синтезаторах. При наличии набора модифицирующих реагентов этот подход не требует дополнительных затрат труда по сравнению с обычным олигонуклеотидным синтезом и поэтому наиболее пригоден при синтезе больших серий модифицированных олигонуклеотидов.

Описанные в литературе реагенты для мечения олигонуклеотидов в процессе фосфитного триэфирного синтеза представлены на схеме 1.

Реагенты типа (1) служат для введения одной репортерной группы по 5'-концу олигонуклеотида. С их помощью можно получить лишь моно-

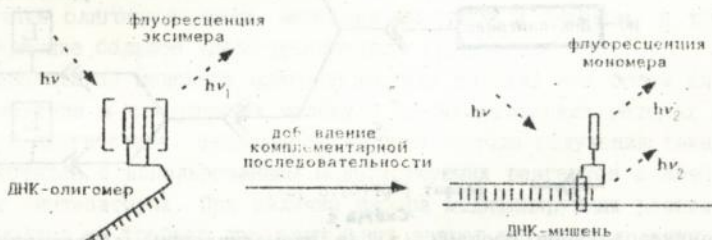
сло молекул метки. Например, если после синтеза олигонуклеотида провести еще два синтетических цикла с реагентом (4), а затем два цикла с реагентом (3), то после деблокирования будет получен модифицированный олигонуклеотид (5), содержащий восемь молекул метки.

В основу настоящей работы были положены блоки типа (3) и (4) ввиду их универсальности.

II.1 Синтез пиренсодержащего фосфамидитного реагента и олигонуклеотидов, меченных пиреном

II.1.1 Синтез пиренсодержащего реагента

Из-за большого времени жизни возбужденного состояния флуоресценция пирена в водных растворах подвергается эффективному тушению. В литературе имеются противоречивые сведения о том, как присоединение к олигонуклеотиду влияет на флуоресценцию пирена. Так, в случае 4-(1-пиренил)бутирильного остатка, введенного по алифатической аминогруппе модифицированного олигонуклеотида, интенсивность флуоресценции практически не изменялась (Telser et al., 1989); присоединение (1-пиренил)метильной группы по 2'-О-атому уридина вызвало значительное снижение квантового выхода флуоресценции (который снижается еще больше при встраивании модифицированного мономера в олигонуклеотид) (Yamana et al., 1992); а реакция N-(1-пиренил)малеимида с тиолмодифицированными олигонуклеотидами приводит к значительному усилению флуоресценции пиренильного остатка (Kumar et al., 1991).



□ - пирен

Схема 2

С целью исследования флуоресцентных свойств меченых олигонуклеотидов в настоящей работе предполагалось синтезировать реагент типа (3), содержащий в качестве метки остаток пирена. В этом случае

при последовательном введении двух блоков (3) по 5'-концу олигонуклеотида можно было ожидать проявления эксимерной флуоресценции. При гибридизации с комплементарной матрицей эксимер должен разрушаться в результате интеркаляции по крайней мере одного пиренильного остатка в ДНК-дуплекс, по данным Kitamura et al. (1991) (см. схему 2).

Использованная нами последовательность реакций в синтезе пиренсодержащего реагента типа (3) изображена на схеме 3. Гладко протекающее ацилирование пирена (6) янтарным ангидридом в присутствии безводного $AlCl_3$ дает 4-(1-пиренил)-4-оксомаляновую кислоту (7). В качестве растворителя для реакции Фриделя-Крафтса вместо использованного ранее нитробензола был взят более летучий нитрометан, что упростило выделение кетокислоты (7). Ее карбонильная группа была восстановлена до метиленовой по реакции Вольфа-Кижнера (термолиз гидразона). Полученная 4-(1-пиренил)бутановая кислота (8) при реакции с пентафторфенолом и N,N' -дидицилогексилкарбодимидом в THF с высоким выходом была превращена в пентафторфениловый эфир (9) в условиях синтеза пентафторфениловых эфиров N -защищенных аминокислот. Взаимодействие активированного эфира (9) с 3-амино-1,2-пропандиолом (10) привело к амидодиолу (11). Для ускорения этой реакции использовалось двойное мольное количество амиддиола (10), один эквивалент которого связывает образующийся кислый пентафторфенол.

Реакция соединения (11) с 4,4'-диметокситритилхлоридом проводилась при $0^\circ C$, что позволило избирательно получить продукт моно-тритилирования по первичной гидроксильной группе (12). Перед использованием в последней стадии это вещество должно быть очищено и тщательно высушено, так как качество реагентов особенно сильно влияет на выход соединения (14). Заключительное фосфитилирование спирта (12) бис-(N,N -диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфонном (13) проводилось в безводном ацетонитриле в присутствии тетразолида диизопропиламония в качестве катализатора. Последние две стадии - тритилирование по первичному и фосфитилирование по вторичному гидроксилу - аналогичны реакции, применяемым в синтезе нуклеотидных блоков для фосфитного триэфирного метода.

Использованный в качестве нуклеотидно-структурной основы блока модифицирующего реагента (\pm)-3-амино-1,2-пропандиол (v) ранее применялся в синтезе реагентов для получения олигонуклеотидов с алифатическими аминогруппами (Nelson et al., 1989). Фосфамидит (ix) представляет собой смесь диастереомеров, поскольку молекула вещества (14) содержит два хиральных центра - 2С-атом 3-амино-1,2-пропан-

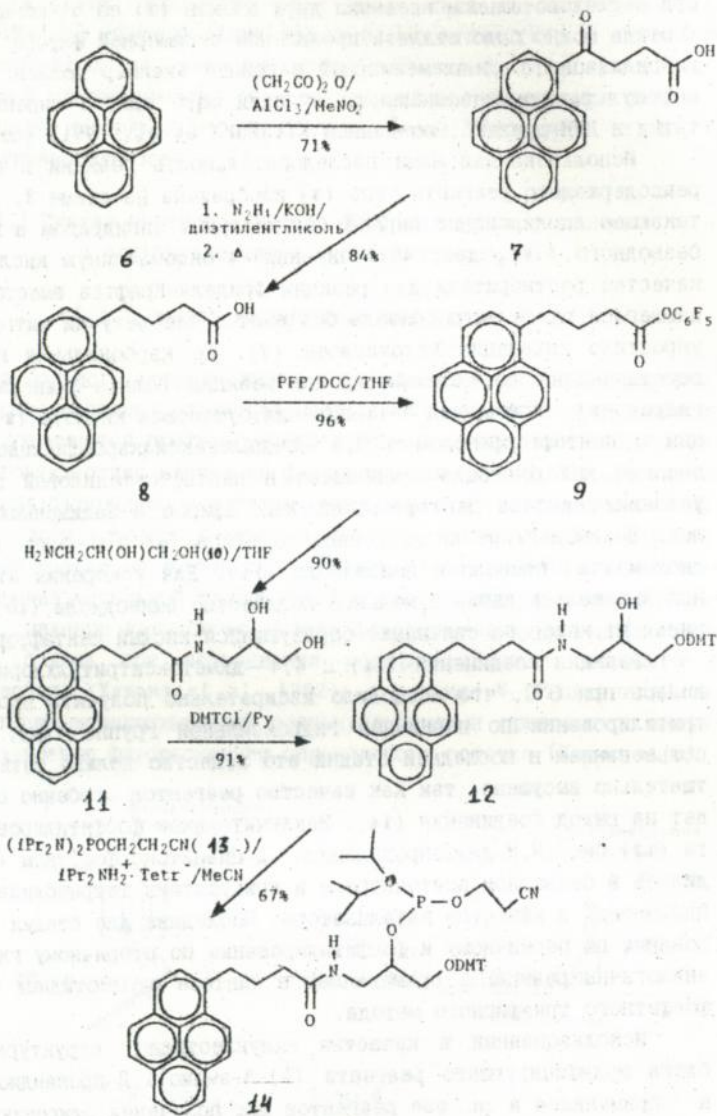


Схема 3

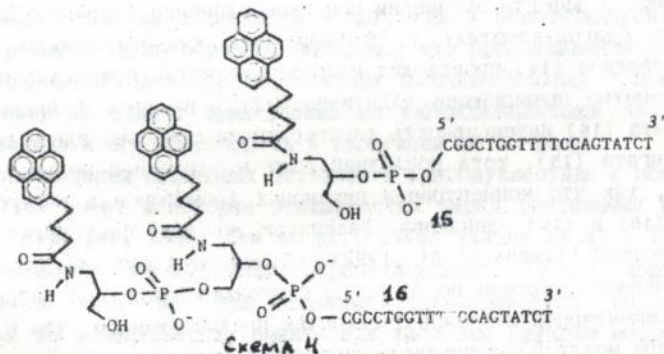
диола и атом фосфора. ^{31}P -ЯМР-спектр соединения (14) в CD_3CN содержит два сигнала приблизительно равной интенсивности при 152,094 и 152,432 м. д., каждый из которых соответствует паре энантимеров.

Синтез реагента (14) довольно прост, его выход составляет 52% в расчете на коммерчески доступную 4-(1-пиренил)бутановую кислоту (8). Вещества (9), (11), (12) и (14) ранее не были описаны.

II.1.2 Синтез и свойства олигонуклеотидов, меченных пиреном

Модифицирующий фосфамидит (14) использовался нами для автоматического синтеза олигонуклеотидов, меченных пиреном. Реагент (14) хорошо растворим в ацетонитриле и может быть использован в обычном синтетическом цикле автоматического синтезатора. С целью увеличения выхода модификации для стадии конденсации был взят 0,2 М раствор фосфамидита (14) в ацетонитриле вместо обычно используемых 0,1 М растворов нуклеозидных фосфамидитов. Время конденсации также было увеличено до 2-3 мин. Выход на этой стадии составлял 95-99% (определен спектрофотометрически по поглощению катиона DMT^+).

Для проверки предположения о существовании эксимерной флуоресценции были синтезированы конъюгаты (15) и (16), которые содержат



один и два пиреновых остатка, присоединенных по 5'-концу олигонуклеотида. В качестве олигонуклеотидной части C_{11} использован обратный праймер для амплификации фрагмента 7-го экзона гена интерлейкина IL-1 α человека (Lubedenko et al., 1991).

Однако предположение, что пиреновые остатки в конъюгате (16) будут ассоциированы и проявят в основном эксимерную флуоресценцию, не подтвердилось. На рис. 1 приведены спектры флуоресценции конъю-

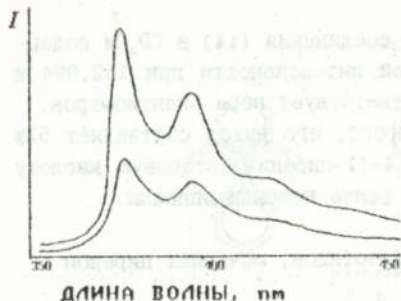


Рис. 1. Спектры флуоресценции меченых пиреном олигонуклеотидов (15) и (16) в воде. Возбуждение при 330 нм, $A_{350} = 0,12$.

гатов (15) и (16) в водном растворе. Видно, что на кривой интенсивности флуоресценции соединения (16) имеется лишь незначительный максимум при 420 нм и не наблюдается эксимерной флуоресценции (широкого максимума в области 450–470 нм). Поскольку спектры флуоресценции модифицированных олигомеров (15) и (16) оказались весьма похожими, зонды вида (16) не могут быть использованы, как предполагалось, для мониторинга их гибридизации с матрицей (см. схему 2). Отсутствие эксимерной флуоресценции в этом случае можно объяснить значительным расстоянием между пиреновыми остатками в конъюгате (16), разделенными 18-атомной цепочкой.

Вместо эффекта эксимерии при присоединении второго остатка пирена к олигонуклеотиду с превращением монопроизводного (15) в дипроизводное (16) происходит возрастание интенсивности флуоресценции, заметно превышающее аддитивное. Так, из рис. 1 видно, что у конъюгата (16) интенсивность флуоресценции примерно вдвое выше, чем у конъюгата (15), хотя последний взят в удвоенной мольной концентрации, так что концентрация пиреновых хромофоров в растворах веществ (15) и (16) одинакова. Рассматривать этот факт можно с помощью гипотезы (Yamana et al., 1992), объясняющей усиление флуоресценции меченого пиреном по 5'-концу олигонуклеотида при гибридизации с комплементарной последовательностью предположением, что в меченом олигомере между 5'-концевым основанием и пиреновым остатком существует стэкинг-взаимодействие, приводящее к эффективному тушению флуоресценции; при гибридизации пиреновый флуорофор выводится из стэкинга и тушение флуоресценции ослабляется. Возможно, в конъюгате (15) за счет стэкинга имеет место тушение флуоресценции, в то время как в конъюгате (16) один пиреновый остаток свободен.

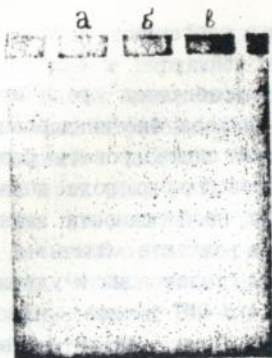


Рис. 2. Электрофорез в 10%-ном ПААГ продуктов амплификации фрагмента 7-го экзона гена IL-1 α . Прямой праймер везде ATG CCTGAGTACCCAAAC. Обратный праймер CGCCTGGTTTTCCA GTATCT (а); (15) (б); (16) (в). Детекция путем прокрашивания бромистым этидием.

Модифицированные олигонуклеотиды (15) и (16) были использованы нами в полимеразной цепной реакции в качестве праймеров для получения терминально меченных продуктов амплификации фрагмента 7-го экзона гена интерлейкина-1 α . Поскольку меченные праймеры (15) и (16) в количестве, использовавшемся для амплификации (30 пмоль), флуоресцируют недостаточно интенсивно, чтобы их можно было увидеть на электрофореграмме, для визуализации продуктов амплификации применяли обычное прокрашивание геля бромистым этидием. Соотношение интенсивности наблюдавшихся полос (рис. 2) позволяет заключить, что оба этих праймера столь же эффективны в ПЦР, как и немодифицированный обратный праймер. Таким образом, показано, что присоединение одного или двух пиреновых остатков по 5'-концу олигонуклеотида с помощью реагента (14) не влияет существенно на гибридизационные свойства олигонуклеотида и его способность к элонгации по 3'-концу.

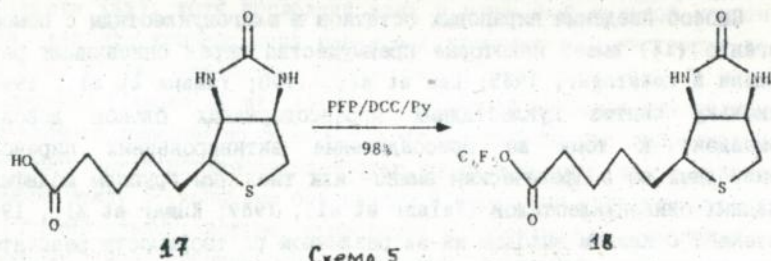
Способ введения пиреновых остатков в олигонуклеотиды с помощью реагента (14) имеет некоторые преимущества перед описанными ранее (Yamana & Letsinger, 1985; Lee et al., 1990; Yamana et al., 1991), поскольку синтез нуклеотидных пиренсодержащих блоков довольно громоздок; к тому же присоединение активированных пиреновых производных по алифатическим амино- или тиольным группам модифицированных олигонуклеотидов (Telser et al., 1989; Kumar et al., 1991) протекает с низким выходом из-за различной растворимости реагентов. В то же время реагент (14) позволяет просто и с высоким выходом получать олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце одну или несколько пиренильных групп.

II.2 Синтез биотинсодержащего реагента

Биотин в настоящее время наиболее употребителен среди меток, присоединяемых к олигонуклеотидам. Для синтеза биотинилированных олигонуклеотидов представлялось необходимым синтезировать реагент типа (3). Однако синтез описанных реагентов такого рода довольно сложен. Анализ литературы показал, что нет необходимости защищать карбамидную функцию биотина в фосфамидитном реагенте. Обычно к этому прибегают для определения выхода реакции конденсации и улучшения растворимости реагента в ацетонитриле (1-N-DMT-защита) или для предотвращения побочных реакций при использовании 5-(4-нитрофенил)-тетразола в качестве кислотного катализатора конденсации в синтезе модифицированных биотином 2'-O'-алкилолигорибонуклеотидов (4-*трет*-бутилбензоильная защита по 1-N-атому) (Pieles et al., 1991).

В качестве нуклеотидной структурной основы реагента был использован диэтанолламин, ранее применявшийся для введения в олигонуклеотиды остатка антрахинона (Lin & Matteucci, 1991). Для снижения стоимости синтеза представлялось также целесообразным использовать биотин в возможно меньшем числе стадий. Поэтому разработанная схема синтеза целевого реагента включает в себя всего три стадии с участием биотина.

Сначала (+)-биотин (17) был превращен в пентафторфениловый эфир (18) (схема 5). Из-за наличия карбамидной группы биотин слабо растворяется в большинстве растворителей, поэтому использование обычного метода синтеза пентафторфениловых эфиров – взаимодействия



соответствующей кислоты с пентафторфенолом и N,N' -дициклогексилкарбодимидом – связано с определенными трудностями (описан синтез соединения (18) из биотина с использованием бис-пентафторфенилкарбоната или пентафторфенилтрифторацетата (Рабинков и др., 1989)).

Превращение (схема 5) удалось провести, применяя пересыщенный раствор биотина в пиридине; в этом случае реакцию с PFP и DCC можно проводить при пониженной температуре, что позволяет избежать побочной реакции образования *N*-ацилмочевины. Эфир (18) был выделен кристаллизацией с выходом 98%. Хотя в присутствии даже следов пиридина и воды этот эфир разлагается, в тщательно высушенном состоянии он устойчив при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

Для взаимодействия биотина с авидином или стрептавидином существенно, чтобы биотиновый остаток был стерически незатрудненным, поэтому во многих случаях биотин присоединяют к биомолекулам через различные спейсеры. В данной работе в качестве такого удлинителя был использован остаток ϵ -аминокапроновой кислоты (19) (схема 6).

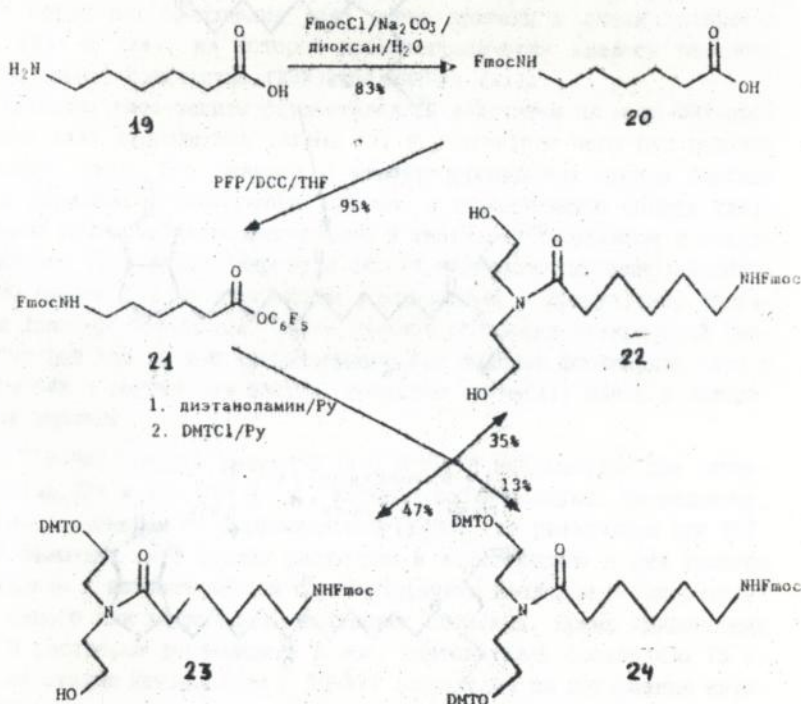
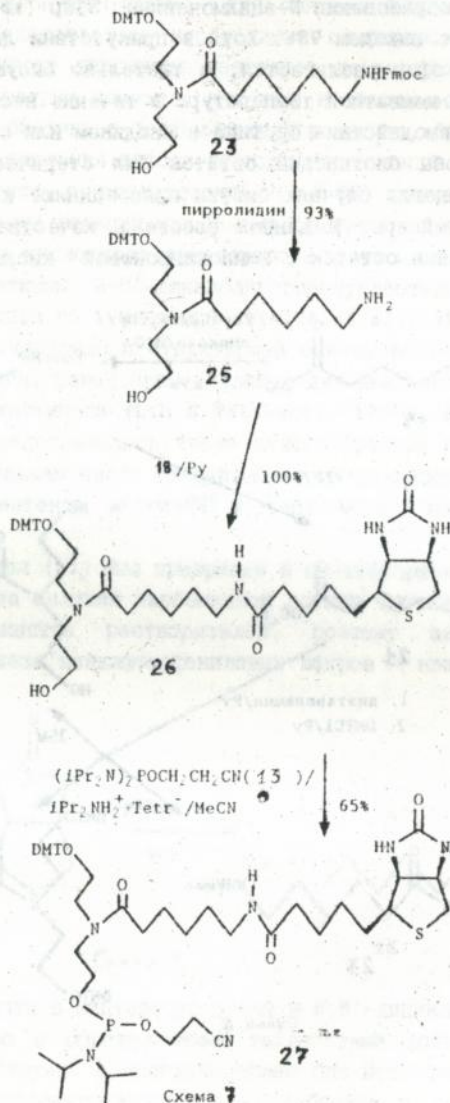


Схема 6



Сначала аминогруппу этой кислоты защитили (9-флуоренил)метоксикарбонильным остатком с образованием Fmoc-производного (20). Полученный из него пентафторфениловый эфир (21) был превращен при взаимодействии с диэтаноламином в пиридине в амидодиол (22), причем реакция протекает практически полностью, так что следующая стадия проводилась без выделения соединения (22).

Обработка реакционной массы эквимольным количеством DMT-Cl привела к смеси продуктов моно- и бис-диметокситритилирования (23) и (24), из которой с помощью колоночной хроматографии выделили целевое соединение (23) с выходом 47%, а также некоторое количество исходного амидодиола (22) и бис-DMT-производного (24). Повторное диметокситритилирование непрореагировавшего соединения (22) и кислотная обработка соединения (24) снова привели к смеси продуктов (22), (23) и (24), из которой хроматографически удалось выделить дополнительное количество (23%) соединения (23).

Удаление Fmoc-защиты осуществлялось действием на моно-DMT-производное (23) пирролидина (схема 7), в результате чего был выделен аминоспирт (25). Его реакция с пентафторфениловым эфиром биотина (18) в пиридине количественно привела к образованию спирта (26). Очищенное колоночной хроматографией и тщательно высушенное в вакууме вещество (26) фосфитилировали бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфином (13) в абсолютном ацетонитриле в присутствии тетразолида диизопропиламмония. После обычной обработки реакционной смеси и быстрой колоночной хроматографии был выделен фосфамидит (27) с выходом 64% в расчете на биотин. Вещества (22)-(27) ранее в литературе не описаны.

В ^{31}P -ЯМР-спектре реагента (27) в CD_3CN наблюдаются два сигнала при 151,239 и 151,520 м. д., которые соответствуют, по-видимому, двум диастереомерам по фосфамидитной группе, не различимым при ТСХ.

Фосфамидит (27) хорошо растворим в ацетонитриле и был успешно использован в автоматическом синтезаторе для введения в олигонуклеотиды одного или нескольких биотиновых остатков. Время конденсации с 0,2 М раствором фосфамидита в абс. ацетонитриле составляло 75 с, выход на стадию конденсации - 90-99% (определен по поглощению катиона DMT^+).

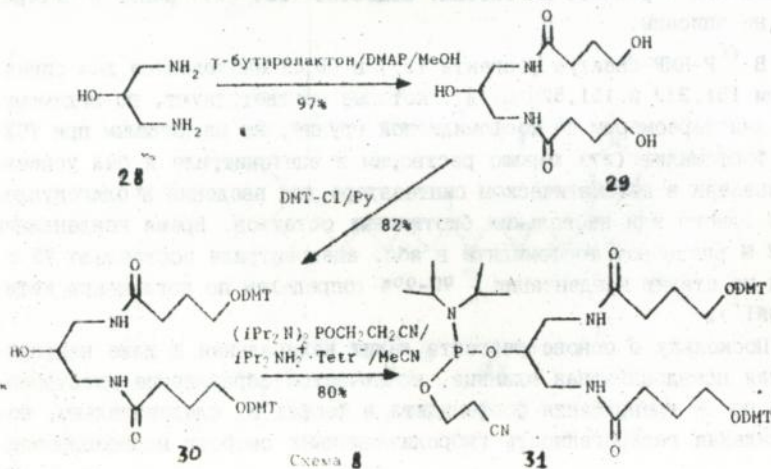
Поскольку в основе реагента лежит нехиральная и даже непрохиральная псевдосахарная единица, исключается образование диастереомеров после превращения фосфамидита в фосфат и, следовательно, потенциальная гетерогенность гибридизационных свойств модифицирован-

II.3 Синтез ненуклеотидных фосфамидитных реагентов для множественного мечения олигонуклеотидов

В процессе работы над проблемой 5'-концевого мечения олигонуклеотидов мы столкнулись с необходимостью разработать удобный и универсальный метод введения нескольких молекул модификатора в олигонуклеотид для изучения взаимосвязи между структурой и свойствами у таких конъюгатов и конструирования меченых зондов и праймеров. За основу был принят принцип "разветвления" 5'-конца (после завершения синтеза нуклеотидной последовательности) с использованием специально разработанных реагентов.

Как уже указывалось выше, реагенты вида (4) представляются оптимальными для получения 5'-полмеченных олигонуклеотидов. Описанные ранее реагенты такого рода (Kwiatkowski et al., 1989) не удовлетворяли нас по ряду причин, в первую очередь из-за сложности их синтеза.

Мы разработали более простой синтез аналогичных реагентов, липофильность и длину ножки которых можно легко изменять. Исходным веществом служит 1,3-диаминопропанол-2, симметричный (нехиральный) аминоксирит. Присоединяя по обеим аминогруппам остатки алифатических ω -гидроксикислот, можно получать структурные основы различных видов для узла разветвления. В рамках такого подхода нами были синтезированы реагенты (31) и (35) с использованием в качестве удлинителей



ножек остатков 4-гидроксимасляной и 12-гидроксидодекановой кислот.

В синтезе реагента с короткими ножками (31) на первой стадии аминспирт (28) был ацилирован γ -бутиролактоном в метаноле при кипячении (схема 8). Эта реакция, приводящая к соединению (29), протекает полностью в течение нескольких часов в присутствии небольшого количества DMAP, известного в качестве сильноосновного катализатора реакций ацилирования. В отсутствие катализатора продукт реакции (29) также образуется, но для полного ее протекания требуется несколько больше времени. Диамидотриол (29) плохо растворим в хлороформе, что использовалось для его выделения и очистки: после осаждения хлороформом из метанольного раствора вещество было получено в кристаллическом виде.

Дальнейшие реакции аналогичны применяемым для синтеза нуклеозидных фосфамидитных блоков. Действием DMT-Cl в пиридине на диамидотриол (29) был получен продукт селективного бис-диметокситритилирования по первичным гидроксильным группам (30). Выход воспроизводим лишь при использовании свежесушенного пиридина, пересаженного DMT-Cl и исключении доступа влаги. Фосфитилирование спирта (30) было проведено действием бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианэтоксифосфина (13) в сухом ацетонитриле в присутствии тетразолида диизопропиламмония. При этом необходимо использовать относительно небольшое для подобных реакций количество катализатора (0,5 экв), а выделение и очистку продукта фосфитилирования, фосфамидита (31), проводить как можно быстрее - в противном случае выход резко падает. Применение в качестве катализатора свободного тетразола сопровождается образованием побочных продуктов, которые практически невозможно отделить колоночной хроматографией; по-видимому, они образуются в результате фосфитилирования по амидной функции. Общий выход модифицирующего реагента (31) составил 64% в расчете на исходный аминспирт (28). В спектре ^{31}P -ЯМР фосфамидита (31) в CD_2CN имеется лишь один сигнал при 151,432 м. д., что согласуется со структурой.

В синтезе реагента с более длинными ножками (35) порядок сборки целевого соединения из блоков был несколько изменен: сначала диметокситритильную защиту вводили в 12-гидроксидодекановую кислоту (32) и лишь затем проводили активацию карбоксила превращением в пентафторфениловый эфир (33) (схема 9). Первичная гидроксильная группа оксикислоты (32) реагировала с DMT-Cl в абсолютном пиридине. Промежуточно образующаяся 12-(4,4'-диметокситритилокси)додекановая

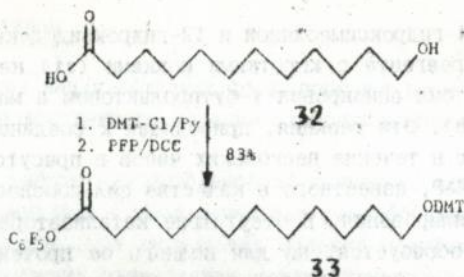


Схема 9

кислоту без выделения обрабатывали пентафторбензолом в присутствии DCC, и активированный эфир (33) выделяли колоночной хроматографией с выходом 83% в виде бесцветного масла, неустойчивого в присутствии следов воды и аминов.

Это соединение в присутствии пиридина в тетрагидрофуране количественно взаимодействует с аминоспиртом (28) (схема 10). Образовавшийся бис-DMT-защищенный диамидотриол (34), структурно аналогичный веществу (30), был выделен колоночной хроматографией. Он довольно плохо растворим в ацетонитриле, поэтому в данном случае при фосфитилировании в качестве растворителя использовали не просто ацетонитрил, а его смесь с метилхлоридом; в остальном же условия реакции были аналогичны тем, в которых фосфитилировали соединение (30). Целевой фосфамидит (35) был выделен с выходом 57%. В спектре

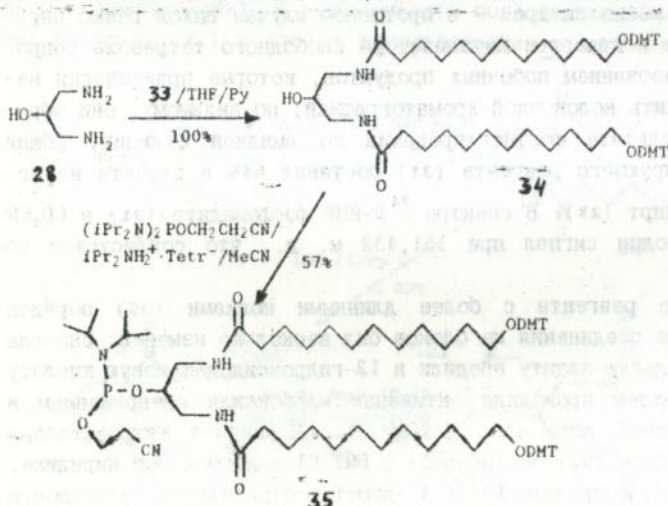


Схема 10

³¹P-ЯМР фосфамидита (35) в CD₃CN, как и в спектре его аналога (31), присутствует один сигнал (при 151,466 м. д.), подтверждающий структуру.

Строение всех промежуточных продуктов и целевых веществ было подтверждено данными ИК-, масс- и ЯМР-спектров. Вещества (29)-(31) и (33)-(35) ранее описаны не были.

Выбор структур реагентов (31) и (35) был обусловлен следующими требованиями:

а) реагенты должны быть пригодны для использования в автоматическом синтезаторе по стандартным или модифицированным программам фосфитного триэфирного синтеза;

б) синтез реагентов должен осуществляться из недорогих реактивов по хорошо воспроизводимым методикам;

в) вводимая с помощью реагентов структурная единица должна выдерживать условия щелочного деблокирования и очистки модифицированного олигомера.

Симметричные реагенты (31) и (35) не создают в модифицированных олигомерах хиральных центров, а следовательно, и диастереомеров. Это, однако, справедливо лишь для идеальных структур, получаемых с помощью таких реагентов и в точности соответствующих ожидаемым. Поскольку же вещества (31) и (35) прохиральны и служат источником хиральности при протекании последующей конденсации лишь по одной ножке, разнообразные "недоразвитые" структуры должны существовать в виде набора диастереомеров.

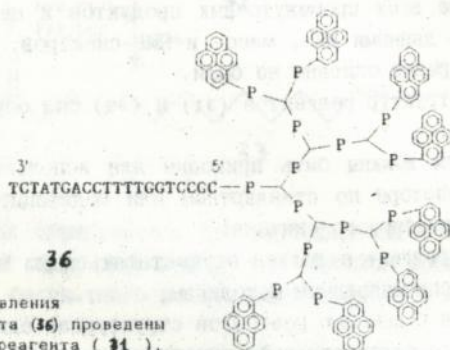
Фосфамидиты (31) и (35) использовались в синтезаторе в виде 0,2 М раствора в абс. ацетонитриле, причем время конденсации не превышало 75 с. Выход на стадию конденсации составлял для реагентов (31) и (35) 95-99% для реакции с 5'-гидроксильной группой нуклеотида растущей цепи и, соответственно, 75-90% и 90-95% для конденсации "на себя" (выходы определены по поглощению катиона DMG⁺).

II.4 Синтез и свойства 5'-меченных олигонуклеотидов

Повышение чувствительности детекции путем увеличения числа вводимых в олигонуклеотид молекул флуорофора в случае флуоресценции дает неудовлетворительные результаты из-за эффективного тушения флуоресценции, обусловленного пространственной близостью флуоресцеиновых остатков (Naralambidis et al., 1991). Для пиренового флуорофора, как отмечалось выше, в случае близкого расположения пи-



ренильных остатков наблюдается эксимерная флуоресценция. Поэтому представляло значительный интерес исследовать флуоресцентные свойства олигонуклеотидов, содержащих большое число пиренильных остатков



Все стадии разветвления в синтезе конъюгата (**36**) проведены с использованием реагента (**31**), а для синтеза конъюгата (**37**) использован разветвляющий реагент (**35**). В схематическом изображении конъюгатов (**36**) и (**37**) символом -P- обозначены фосфатные группы.

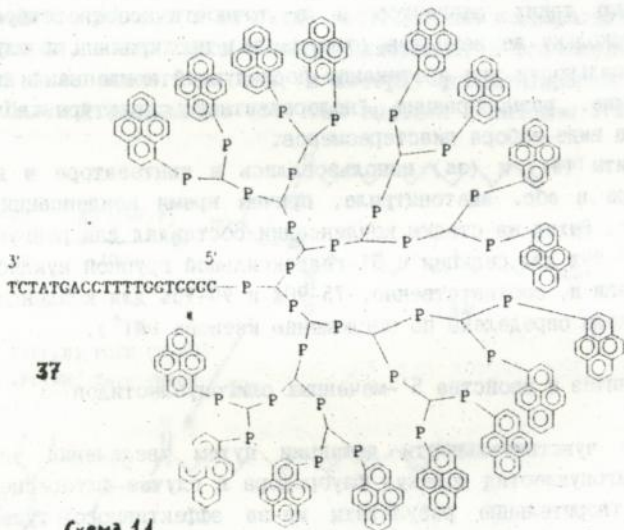


Схема 14

ков. С помощью модифицирующих реагентов (**14**), (**31**), (**35**) были синтезированы олигонуклеотиды с предполагаемыми структурами (**36**) и (**37**).

После деблокирования смесью моноэтаноламина с этанолом 1:1 олигонуклеотиды осаждались 5-10-кратным объемом ацетона из 2 М водного LiClO_4 . Осаждение проходило эффективно, о чем легко судить по флуоресценции, хотя можно было ожидать, что большое число гидроробных остатков в конъюгатах (36) и (37) приведет к значительному повышению их растворимости в ацетоне. Затем олигонуклеотиды подвергались очистке электрофорезом в денатурирующем ПААГ (7 М мочевины). По завершении электрофореза при облучении УФ-светом четко видны полосы, флуоресцирующие зеленым цветом (рис. 3). Подвижность олигонуклеотидов сильно зависит от степени разветвления. Олигонуклеотид (15), содержащий один пиренильный остаток и выделявшийся таким же образом, на геле невооруженным глазом не виден. Олигомер (16) с двумя пиренильными остатками виден с трудом.

Ясно видно наличие большого числа пятен на треках олигомеров (36) и (37). Это неудивительно, поскольку выход на стадии модификации был относительно невысоким и поэтому должно существовать большое число разнообразных "недоразвитых" структур (например, для вещества (36) таких структур может быть не менее 7, а для вещества (37) не менее 56 только за счет разветвляющих реагентов).

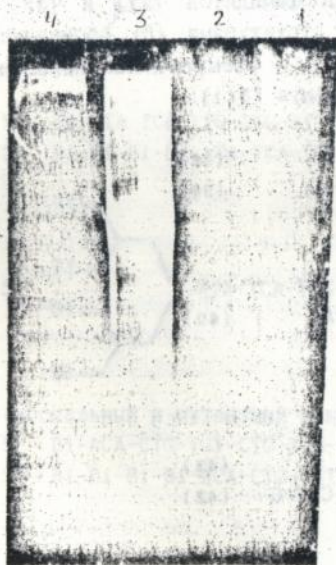
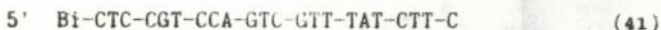
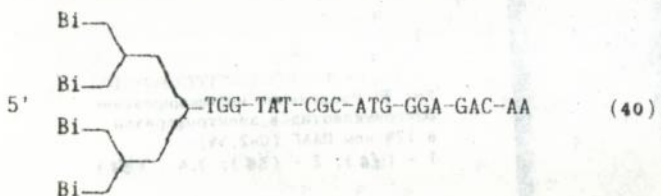
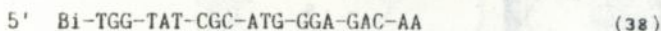


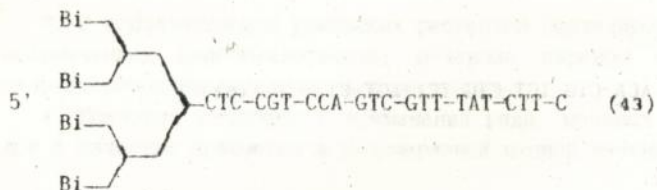
Рис. 3. Разделение модифицированных олигонуклеотидов электрофорезом в 12%-ном ПААГ (С-2,5%):
1 - (16); 2 - (36); 3, 4 - (37)

Интересно сравнить треки 3 и 4 на рис. 3. В карман 4 был нанесен олигонуклеотид, выделенный электрофорезом ранее и соответствующий пятну, отмеченному стрелкой. Видно, что при повторном электрофорезе его подвижность соответствует верхнему пятну в треке 3 (количество олигонуклеотидов в лунках 3 и 4 соответственно составляет 0,6 и 0,1 OD^{3,3}). Объяснить такое изменение подвижности затруднительно. Возможно, что первоначально неблагоприятно ориентированные молекулы конъюгата (37) вблизи старта подвергаются механическому удерживанию в поперечно-сшитом ПААГ. Не исключено также, что после элюирования из геля происходит частичная самоагрегация модифицированных олигомеров (37).

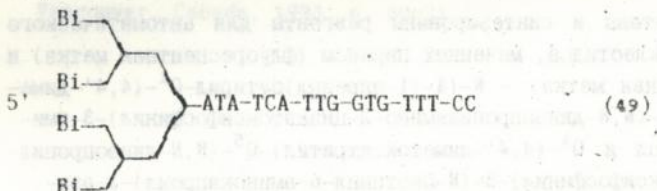
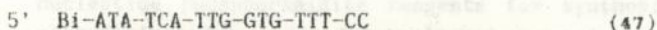
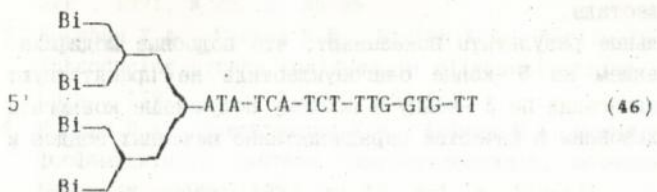
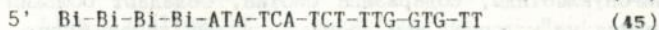
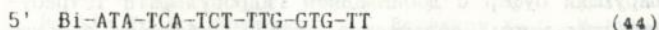
Флуоресцирующие верхние полосы вырезались и подвергались элюированию 2 М водным LiClO₄. Степень элюирования олигонуклеотидов (36) и (37) невысока и даже при неоднократных последовательных сменах буферного раствора не превышает 50% (судя по наблюдаемой флуоресценции). Интересно, что после элюирования из геля полимодифицированные олигонуклеотиды плохо осаждаются этанолом или ацетоном, поэтому они были обессолены гелем-фильтрацией на сефадексе.

С использованием модифицирующих фосфамидитов (27) и (31) синтезированы олигомеры со следующими структурами (Bi обозначает остаток биотина, вводимый реагентом (27); схематически показаны также разветвления, образующиеся из реагента (31)):

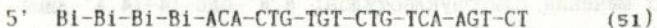
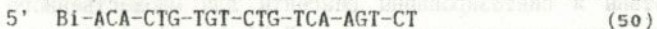


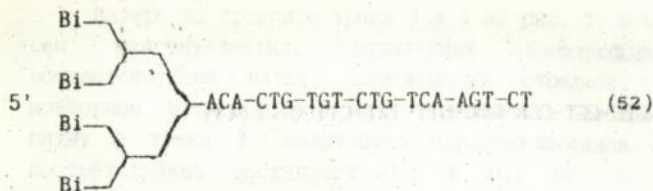


(праймеры для амплификации участка генома
вируса простого герпеса 2)



(нормальный и мутантный зонды для гена кистозного фиброза человека)





(зонд для диагностики цитомегаловируса человека)

После аммонолиза и осаждения ацетоном олигонуклеотиды выделялись с помощью препаративной ион-парной ОФВЭЖ (колонка с обращенной фазой С18 и элюирующий буфер с добавлением гидросульфата тетрабутиламмония). Олигонуклеотиды, содержащие биотин, обладают большим временем удерживания на колонке, чем соответствующие немодифицированные олигонуклеотиды.

Предварительные результаты показывают, что подобные модификации с разветвлением на 5'-конце олигонуклеотида не препятствуют гибридизации и элонгации по 3'-концу и поэтому полученные конъюгаты могут быть использованы в качестве нерадиоактивно меченных зондов и праймеров.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и синтезированы реагенты для автоматического синтеза олигонуклеотидов, меченных пиреном (флуоресцентная метка) и биотином (аффинная метка) - N-(4-(1-пиренил)бутирил-0¹-(4,4'-диметокситритил)-0²-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-3-амино-1,2-пропандиол и 0¹-(4,4'-диметокситритил)-0⁵-(N,N-диизопропил-амино-2-цианэтоксифосфинил)-3-(N-биотинил-6-аминокапроил)-3-аза-1,5-пентандиол.

2. Разработаны и синтезированы реагенты для множественного нерадиоактивного мечения олигонуклеотидов: N,N'-бис-(4-(4,4'-диметокситритилокси)бутирил)-0²-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-1,3-диаминопропанол-2 и N,N'-бис-(12-(4,4'-диметокситритилокси)додеканойл)-0²-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-1,3-диаминопропанол-2.

3. С использованием указанных реагентов синтезирован ряд моно- и полимеченных олигонуклеотидов; меченные пиреном олигонуклеотиды охарактеризованы спектрами флуоресценции.

4. Показана возможность применения ряда меченых олигонуклеотидов в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции.

Список публикаций по теме диссертации

1. Korshun V.A., Boreskov Yu.G., Pestov N.B., Berlin Yu.A. Non-nucleotide phosphoramidite reagent for non-radioactive polylabeling of oligo- and polynucleotides. - Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 1991, N 24, p. 269.
2. Berlin Yu.A., Korshun V.A., Boreskov Yu.G. Multiple non-radioactive labeling of oligonucleotides. - Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 1991, N 25, p. 85-86.
3. Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Yu.A. Reagent for introducing pyrene residues in oligonucleotides. - Bioconjugate Chem., 1992, v. 3, N 6, p. 559-562.
4. Коршун В.А., Ножевникова Е.В., Берлин Ю.А. Новый реагент для фосфамидитного синтеза олигонуклеотидов, меченных биотином. - Биоорг. химия, 1993, т. 19, № 1, с. 139-141.
5. Korshun V.A., Pestov N.B., Prokhorenko I.A., Berlin Yu.A. Non-nucleotide phosphoramidite reagents for synthesis of modified oligonucleotides. - In: International symposium on nucleic acids and membranes (in honour of Dr. H.G.Khorana). Abstracts. - Vancouver, Canada, 1993, p. 30-31.

Подписано к печати 11.08.93. Формат 60x84/16
Усл. печ. л. 4,4 Тираж 100 экз. Бесплатно. Заказ 698.

ИПП Госэкономплана Республики Беларусь.

1910/11

Бесплатно.

АВ 36.487

ИЗДАНИЕ 1987