



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 9 * №10 * 1983

УДК 547.962.32.07 : 577.113.6

ПРИМЕНЕНИЕ N-МЕТИЛИМИДАЗОЛИДНОГО ФОСФОТРИЭФИРНОГО МЕТОДА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛЕЗНЫХ ПРИ ИЗУЧЕНИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

*Ефимов В. А., Бурякова А. А., Ревердатто С. В.,
Тахмажчева О. Г.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен химический синтез более 20 олигодезоксирибонуклеотидов, представляющих собой специфические праймеры, молекулярные зонды, линкеры, адаптеры для идентификации, клонирования и экспрессии фрагментов ДНК. Синтез проводился N-метилимидазолидным фосфотриэфирным методом в растворе и на полимерных носителях. В качестве последних использовались аминированные полимеры на основе полистирола, силикагеля и стекла. Предлагается ряд усовершенствований триэфирного подхода, касающихся удаления с олигонуклеотидов защитных групп в процессе синтеза и после его завершения, присоединения первого нуклеозидного звена к твердой фазе, а также очистки соединений при синтезе в растворе.

Синтетические олиго- и полинуклеотиды заданной структуры являются уникальными инструментами для решения важных молекулярно-биологических задач. Достижения в области направленного химико-ферментативного синтеза нуклеиновых кислот сделали возможным получение искусственных генетических структур, а также широкое использование небольших синтетических фрагментов ДНК для идентификации, выделения, определения первичной структуры и обеспечения функционирования природных ДНК, в частности генов некоторых важных для медицины пептидов и белков [1]. В подобных исследованиях при манипулировании с природными нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК) олиго- и полинуклеотиды играют роль специфических праймеров, молекулярных зондов, линкеров, адаптеров, регуляторных элементов и т. п. В настоящем сообщении представлен химический синтез ряда несущих такие функции олигодезоксирибонуклеотидов с помощью недавно разработанного N-метилимидазолидного фосфотриэфирного метода в растворе и на полимерных носителях [2].

Синтезированные олигонуклеотиды, структуры которых приведены в табл. 1, по их функциональной значимости можно разделить на несколько групп. К первой из них относятся специфические затравки для проведения обратной транскрипции мРНК и получения дуплексов на основе однократочных ДНК. Так, олигонуклеотид (XV) комплементарен 3'-концу мРНК лейкоцитарного интерферона F, олигомер (ХIII) — мРНК фибробластного интерферона, гексадекамер (XIX) и пентадекамер (XIV) — мРНК иммунного интерферона [3, 4]. Соединения (XVII) и (XVIII) являются праймерами к 3'-концам копийных ДНК лейкоцитарного и иммунного интерферонов соответственно, а олигонуклеотиды (XX) и (XXI) представляют собой затравки для определения первичной структуры фрагментов ДНК, клонированных в фаговом векторе M13mp8 (или M13mp7) и по EcoRI-сайту плазмида pBR 322, дидезокси-методом [5, 6]. Олигонуклеотиды, принадлежащие ко второй группе, являются молекулярными зондами, необходимыми для скрининга бактериальных колоний, содержащих рекомбинантные ДНК со встроенными в них генами. При этом структура гексадекануклеотида (XVI) соответствует последовательности, оди-

Таблица 1

Олигонуклеотид *	Схема синтеза	Способ синтеза **	Выход, % в расчете на 3'-концевое звено
(I) GAGATCTC	2+2+4	В растворе	33
(II) GGGATCCC	2+2+4	»	29
(III) AATTCCGGAGG	2+4+4	»	55
(IV) AATTCCCTCCG	2+2+2+4	»	60
(V) AATTCACTGT	3+4+4	»	48
(VI) GATCACACATG	3+4+4	»	41
(VII) AATTGTTAACG	1+2×5	P _g	29
(VIII) AATTCCGTTAAC	1+2×5	P _g	32
(IX) AATTCCGGAGGTG	2+2+4+4	В растворе	34
(X) AATTCCACCTCCG	2+2+4+4	»	60
(XI) AATTCCCCGGGA	1+1+2×5	P _{ps}	25
(XII) AGCTTCCCCGGGG	1+1+2×5	P _{si}	22
(XIII) TCAGTTCCGGAG	2+2+4+4	В растворе	22
(XIV) AGGCAGGACAACCAT	1+2×7	P _g	37
(XV) GAGTTTATTCTCTTCT	2+2+4+8	В растворе	30
(XVI) TCTCATGATTTCTGCT	2+2+4+4+4	»	15
(XVII) CCTGTGATCTGCCCTCA	2+2+4+8	»	11
(XVIII) TGTTACTGCCAGGACC	2+2+4+8	»	24
(XIX) TTCAAATATTGCAGGC	2+2+4+8	»	20
(XX) TCCCAGTCACGACGTT	2+2+4+8	»	21
(XXI) GTATCAGCAGGCCCTT	2+2+4+8	»	27
(XXII) GATTCTCGCATTGTG	3+2+4+8	»	5
(XXIII) CGATCAGTCGCTGGTCG	2+2+4+4+5	»	12
(XXIV) TTATAGTCAAAATAAAGCGAA	2+2+4+8+6	»	10

* Символ d для обозначения дезоксирияда везде опущен.

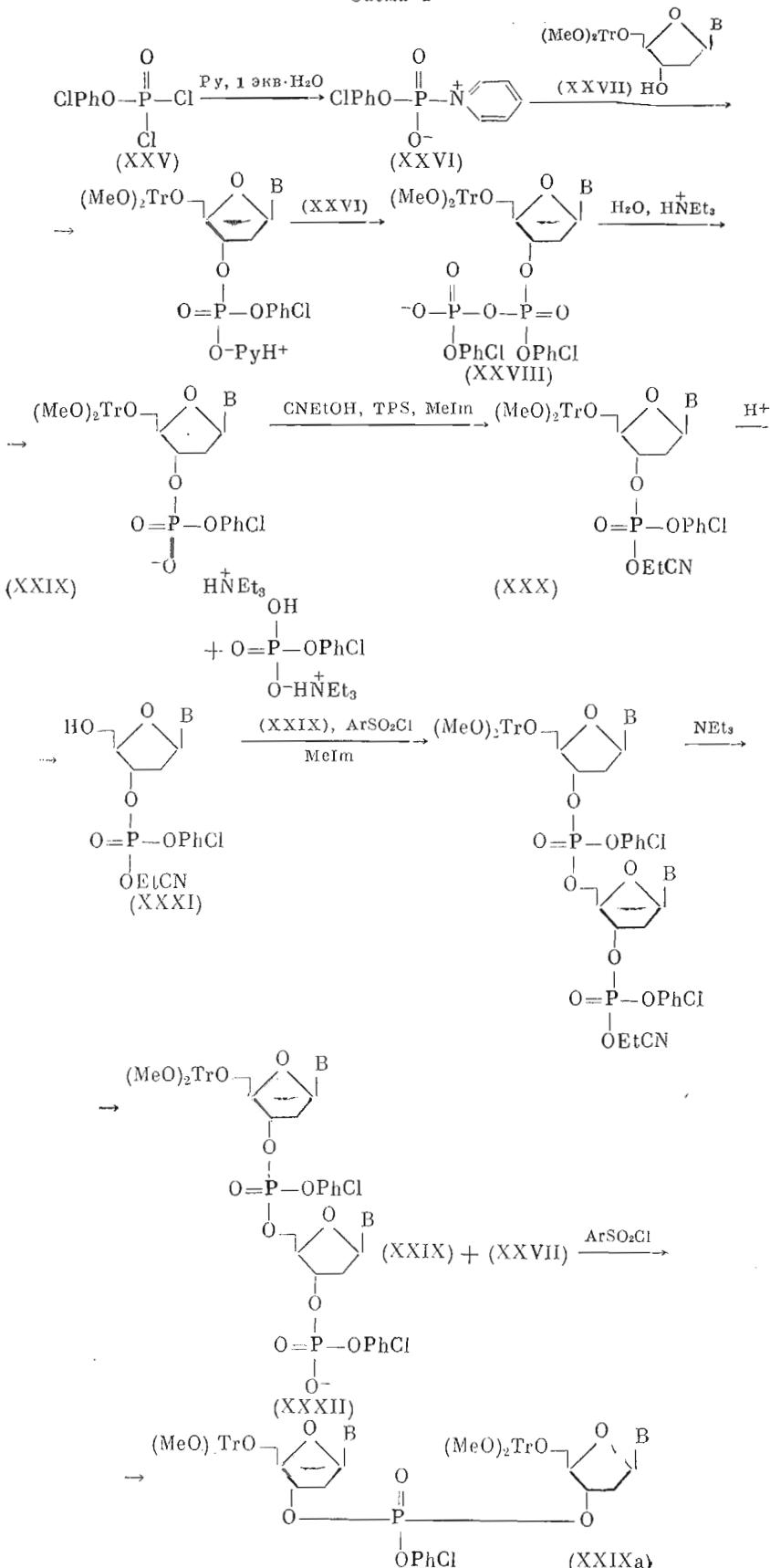
** P_g, P_{ps} и P_{si} — синтез с использованием полимеров на основе соответственно стекла, полистирола и силикагеля.

наковой у всех известных генов интерферонов (участок между 505-м и 520-м нуклеотидами) [3, 7], последовательность гептадекамера (XXII) — участку гена лейкоцитарного интерферона В между 125-м и 141-м нуклеотидами [3], а структура гептадекамера (XXIII) — 3'-концу гена бактериального родопсина [8]. 22-Мер (XXIV) синтезирован с целью проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза промоторной области ДНК бактериофага fd [9]. К последней группе относятся адаптерные (III) — (VI), (IX), (X) и ликерные (I), (II), (VII), (VIII), (XI), (XII) последовательности, содержащие сайты некоторых эндонуклеаз рестрикции, кодон инициации транскрипции, а также последовательности, кодирующие рибосомсвязывающие участки мРНК.

N-Метилимидазолидный метод, использованный в данной работе для получения олигонуклеотидов, позволяет значительно сократить время, затрачиваемое на синтез и очистку индивидуальных соединений по сравнению с традиционными вариантами триэфирного подхода [2, 10]. Основная особенность этого метода заключается в использовании для создания межнуклеотидной фосфотриэфирной связи высокоэффективных конденсирующих реагентов — арилсульфохлоридов в присутствии N-метилимидазола, что создает возможность проведения межнуклеотидных конденсаций не только в пирдине, являющемся традиционным растворителем для олигонуклеотидного синтеза, но и в других органических растворителях, таких, как диоксан, ацетонитрил, хлористый метилен, хлороформ, нитрометан и др. Кроме того, этот метод полностью исключает использование производных триазола и тетразола в качестве конденсирующих и фосфорилирующих средств.

Для синтеза защищенных мономеров, N-блокированных 5'-диметокситритилдезоксинуклеозид-3'-хлорфенилфосфатов (XXIX) и дезоксинуклеозид-3'-хлорфенил-β-цианэтил)фосфатов (XXXI), применялся способ, в котором для введения остатка n-хлорфенилфосфата в молекулу нуклеозида по 3'-гидроксилу использовалось n-хлорфенилфосфопиридиниевое производное (XXVI) (схема 1). Этот монофункциональный фосфорилирующий реагент получался прибавлением 1 экв. воды к раствору арилди-

Схема 1



B = T, bzA, anC или iBzG
 MeIm = N-метилимидазол

хлорфосфата (XXV) в пиридине [2]. Фосфорилирование 5'-диметокситрityлнуклеозидов (XXVII) фосфорилирующим реагентом (XXVI) в преративном масштабе проводилось в течение 30–40 мин при 3–5-кратном избытке реагента, предварительно отделенного от осадка хлоргидрата пиридина. Реакцию останавливали прибавлением водного раствора бикарбоната триэтиламмония и фосфодиэфир (XXIX) отделяли от избытка арилфосфата экстракцией хлороформом. При этом выходы *n*-хлорфениловых эфиров (XXIX) составляли 90–95 %.

Использование фосфорилирующего реагента (XXVI) и метод его получения имеют ряд преимуществ перед процедурами, описанными для этих целей в литературе. В отличие от обычно использующихся в триэфирном подходе арилфосфоди-(1,2,4-триазолидов) [11] арилфосфониридиневые производные представляют собой монофункциональные фосфорилирующие реагенты, что исключает возможность образования таких побочных продуктов, как симметричные 3'-3'-динуклеозидмонофосфаты (XXIXa). Кроме того, применение реагента (XXVI) не приводит к образованию устойчивых модификаций гетероциклических оснований нуклеотидов, как это имеет место при фосфорилировании арилфосфодитриазолидами [12]. Исходные соединения для получения реагента (XXVI), арилдиоксифосфаты, легко доступны и могут храниться при комнатной температуре без доступа влаги длительное время. Избыток фосфорилирующего реагента после разложения водой легко удаляется экстракцией. Выходы фосфодиэфиров нуклеозидов (XXIX), синтезированных по предлагаемому методу, не уступают выходам, полученным при использовании арилфосфодитриазолидов, а экспериментальная процедура проще. При работе с фосфорилирующим реагентом (XXVI) не наблюдается удаления диметокситритильной группы с защищенных нуклеозидов в процессе реакции, хотя в реакционной смеси присутствует некоторое количество хлоргидрата пиридина.

Как известно, то же активное фосфорилирующее соединение (XXVI) образуется в пиридине при действии арилсульфохлоридов на фосфомоноэфиры или при действии пиридина на арилметилхлорфосфаты [2, 13]. Так, в ранних работах по триэфирному методу синтеза олигонуклеотидов описано получение фосфодиэфиров нуклеозидов (XXIX) действием на 5'-диметокситритильнуклеозиды (XXVII) арилфосфатов в присутствии избытка арилсульфохлорида [14]. Хотя активное фосфорилирующее соединение, образующееся в этом случае, также представляет собой фосфониридиневый бетаин (XXVI), этот метод не нашел широкого распространения, с одной стороны, из-за трудности отделения продукта реакции от избытка конденсирующего реагента, а с другой — из-за постоянного присутствия в реакционной смеси побочных продуктов типа (XXIXa), образующихся вследствие активации фосфодиэфира нуклеозида (XXIX) избытком арилсульфохлорида (схема 1). Предлагаемый метод лишен этих недостатков, поскольку соединение (XXIX) получается в данном случае без участия конденсирующих реагентов. Следует отметить, что арилметилхлорфосфаты в пиридине также являются хорошими фосфорилирующими реагентами, тем более что в данном случае в процессе получения фосфорилирующего реагента вместо хлоргидрата пиридина выделяется хлористый метилпиридиний, представляющий собой устойчивое нейтральное соединение. Однако из-за некоторых трудностей при приготовлении чистого арилметилхлорфосфата в преративных количествах этот источник активированного производного (XXVI) менее доступен, чем арилдиоксифосфат. Отсюда следует, что наш способ получения соединения (XXVI) наиболее прост и удобен при синтезе защищенных мононуклеотидов.

Полностью блокированные нуклеозид-3'-фосфаты (XXX) получали из соответствующих 5'-диметокситритиль-3'-*n*-хлорфенилфосфатов нуклеозидов (XXIX) действием избытка β-цианэтанола в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида (TPS), как это описывалось ранее [15], или смеси этого конденсирующего реагента с N-метилимидазолом [2] (схема 1). Фосфотриэфир (XXX) без выделения детритилировали действием арилсульфокислоты в смеси хлороформ — метанол и подготовленный таким

Таблица 2

Сравнение скоростей реакций дегидратации и апуринизации (20° С)

Соединение	Реагент *	Растворитель	Время полного дегидратации **, мин	Апуринизация ***, %/мин.
[(MeO) ₂ Tr]bzA(Ac)	2% TSA	CHCl ₃ —CH ₃ OH, 7 : 3	<1	1
	2% TSA	CH ₃ CN	<1	30
	2% TSA	Диоксан	~1	10
	2% TCA	CH ₃ CN	2	0,1
	5% TCA	CHCl ₃	<1	2,5
	10% TCA	CHCl ₃	<1	0,4
	10% TCA	CH ₃ CN	<1	0,5
	1% TFA	CHCl ₃	0,25	2,5
	1% TFA	CH ₃ CN	2	0,05
	2% TFA	CHCl ₃	<0,1	5
	2% TFA	CH ₃ CN	1	0,15
	2% TFA	2% CH ₃ OH в CHCl ₃	0,1	0,4
	2% TFA	5% CH ₃ OH в CHCl ₃	0,25	0,1
	2% TFA	10% CH ₃ OH в CHCl ₃	0,5	0,025
	2% TFA	CH ₃ OH—CHCl ₃ , 3 : 7	<1	0,01
	2% TFA	CH ₃ CN — диоксан, 75 : 25	<1	0,1
	2% TFA	CH ₃ CN—CHCl ₃ , 1 : 3	0,5	0,5
	2% TFA	CH ₃ CN	—	0,05
(Ac)bzA-P _g	2% TFA	CH ₃ CN—CHCl ₃ , 1 : 3	—	0,1
	2% TFA	CH ₃ CN—CHCl ₃ , 7 : 3	—	0,05
	2% TFA	CHCl ₃	—	1,4
	2% TFA	2% CH ₃ OH в CHCl ₃	—	0,1
	2% TFA	10% CH ₃ OH в CHCl ₃	—	0,005
[(MeO) ₂ Tr]bzA-P _g	2% TFA	CH ₃ CN	3—4	0,15
	2% TFA	CH ₃ CN—CHCl ₃ , 1 : 3	1	0,45
	2% TFA	CH ₃ CN—CHCl ₃ , 7 : 3	2	0,25
	2% TFA	2% CH ₃ OH—CHCl ₃	0,5	0,40
	2% TFA	10% CH ₃ OH в CHCl ₃	2,5	0,025
[(MeO) ₂ Tr]ibG-P _g	5% TFA	CH ₃ CN	2,5	0,35
	2% TFA	CH ₃ CN	5	0,04

* TSA — *n*-толуолсульфокислота, TCA — трихлоруксусная кислота, TFA — трифторуксусная кислота.

** Время полного дегидратации определяли спектрофотометрически при 498 нм по количеству отщепившегося диметокситритилятиона.

*** При работе в растворе апуринизация определялась спектрофотометрически после разделяния продуктов реакции ТСХ на силикагеле. Апуринизация на полимерных носителях определялась так, как описано в «Экспериментальной части».

образом мономерный 5'-гидроксильный компонент (XXXI) выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле.

Наращивание олигонуклеотидной цепи при синтезе в растворе проводилось от 3'- к 5'-концу последовательным прибавлением к 3'-концевому динуклеозидмонофосфату, у которого 3'-гидроксильная группа блокирована бензоильной групой, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- или октануклеотидных блоков типа (XXXII). Схемы синтеза всех сегментов и выходы в расчете на 3'-концевое звено приведены в табл. 1. В межнуклеотидные конденсации обычно вводился не более чем 1,2—1,5-кратный избыток 3'-фосфатного компонента относительно гидроксильного компонента, 2—3-кратный избыток арилсульфохлорида и 4—6-кратный избыток N-метилимида зола относительно фосфатного компонента.

Как уже описывалось ранее [2], при получении ди-, три- и тетрануклеотидных блоков в качестве растворителей использовались ацетонитрил и нитрометан. Реакции конденсации проводились в течение 5—10 мин. Реакции при получении более длинных олигонуклеотидов осуществлялись в течение 10—30 мин в пиридине, хлористом метилене или смеси ацетонитрила с другими растворителями (пиридином, диоксаном, хлороформом и т. д., до 50% последних), поскольку растворимость олигонуклеотидов в чистом ацетонитриле (или нитрометане) резко падает при увеличении длины цепи. Оптимизация условий проведения межнуклеотидных конденсаций осуществлялась на основании исследований, описанных в работе [2].

Для удаления 5'-диметокситритильной защитной группы с промежуточных соединений перед проведением очередной стадии наращивания

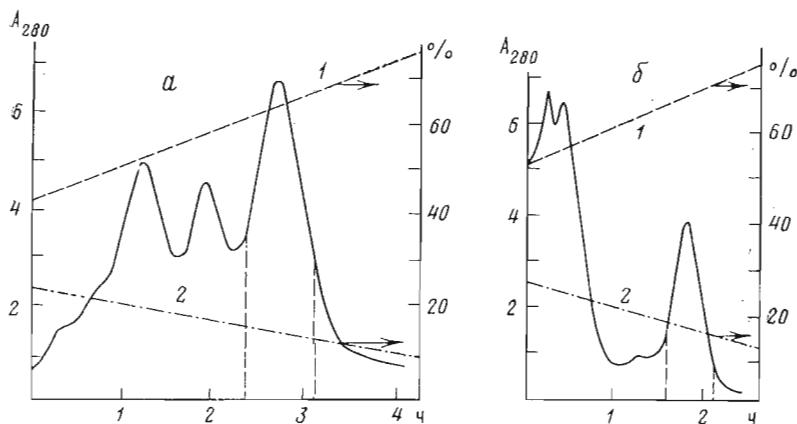


Рис. 1. Выделение полностью блокированных олигонуклеотидов (XVIII) (а) и (XXII) (б) после проведения реакций межнуклеотидных конденсаций обращенно-фазовой хроматографией на колонке с сорбентом Nucleosil 30 C₁₈ в 0,1 М ацетате аммония в градиенте концентрации ацетонитрила (1) и диоксана (2). Отмечены собираемые фракции

цепи наряду с традиционной обработкой 2% арилсульфокислотой в хлороформе, содержащем до 30% метанола при 0°С [11], использовалась обработка 2% трифторуксусной кислотой в той же смеси растворителей при комнатной температуре. Как показали эксперименты по сравнению скоростей реакций дегидратации и побочной реакции апуринизации при действии ряда реагентов в различных растворителях, результаты которых приведены в табл. 2, в последнем случае процесс разрыва гликозидной связи у производных пуринов, в частности аденоцина, протекает значительно медленнее, чем при действии арилсульфокислоты, а скорость дегидратации остается на том же уровне.

Защищенные олигонуклеотиды на первоначальных стадиях синтеза выделялись хроматографией на колонках с силикагелем в градиенте концентрации метанола в хлороформе. Для выделения полностью блокированных олигомеров с длиной цепи более 8 мономерных звеньев использовалась впервые предложенная в работе [2] хроматография в режиме обращенной фазы на колонках с сорбентом Nucleosil C₁₈ в водном ацетонитриле.

Как известно, адсорбционная хроматография на силикагеле наиболее распространенный метод очистки продуктов межнуклеотидных конденсаций в триэфирном подходе. Однако с увеличением длины цепи разрешающая способность этого метода резко падает, и на уровне октануклеотида уже трудно отделить продукт реакции от непрореагировавшего нуклеозидного компонента и побочных продуктов даже с помощью современных способов высокоэффективной колоночной хроматографии под высоким давлением. Это снижает выходы на последующих стадиях синтеза и усложняет процедуру очистки конечных соединений, а следовательно, ограничивает возможности метода для синтеза длинных олигонуклеотидов в растворе.

В сообщении [2] было показано, что эффективная очистка полностью блокированных олигонуклеотидов может быть достигнута обращенно-фазовой хроматографией в водном ацетонитриле, содержащем ацетат триэтиламмония, под умеренным давлением на сорбенте Nucleosil 30 C₁₈. Наряду с этим сорбентом в последнее время для тех же целей нами были опробованы сорбенты Zorbax C-8 и Lichrosorb 10 RP18. Оказалось, что отработанные на сорбенте Nucleosil 30 C₁₈ условия хроматографии — градиент концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (или та же система с добавлением диоксана) — могут быть с небольшими изменениями использованы и при работе на этих сорбентах в условиях хроматографии высокого давления. Некоторые кривые элюции приведены на рис. 1. Полученные результаты показывают, что характер разделения в этих условиях напоминает анионообменную хроматографию незащищенных олигонуклео-

Последовательность операций в одном цикле наращивания
при синтезе на полимерных носителях *

Стадия	Реагенты и растворители **	Время, мин
Набухающий полимер (P_{ps})		
1	2% TFA в $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CN}$ (3 : 1), 3 мл	2×2
2	CHCl_3 , 5 мл	2×0,5
3	Реакционная смесь *** в CHCl_3 , 0,3 мл	20 или 30
4	CHCl_3 , 5 мл	2×0,5
5	$\text{CHCl}_3\text{-Ac}_2\text{O-MeIm}$ (8,5 : 1 : 0,5), 1 мл	3–5
6	CHCl_3 , 5 мл	2×0,5
Ненабухающий полимер (P_g или P_{si})		
1	2% TFA в $\text{CH}_3\text{CN-CHCl}_3$ (7 : 3), 5–7 мл	5–7
2	$\text{CH}_3\text{CN-CHCl}_3$ (7 : 3), 10 мл	2–4
3	Реакционная смесь *** в $\text{CH}_3\text{CN-CHCl}_3$ (7 : 3), 0,3 мл	10 или 20
4	$\text{CH}_3\text{CN-CHCl}_3$ (7 : 3), 10 мл	2–4
5	$\text{CH}_3\text{CN-Ac}_2\text{O-MeIm}$ (8 : 1 : 1 или 8,5 : 1 : 0,5), 1 мл	3–5
6	$\text{CH}_3\text{CN-CHCl}_3$ (7 : 3), 10 мл	2–4

* P_g , P_{ps} и P_{si} — см. примечание к табл. 1; приведены данные в расчете на 100 мг полимера.

** Вместо хлороформа во всех случаях может быть использован хлористый метилен.

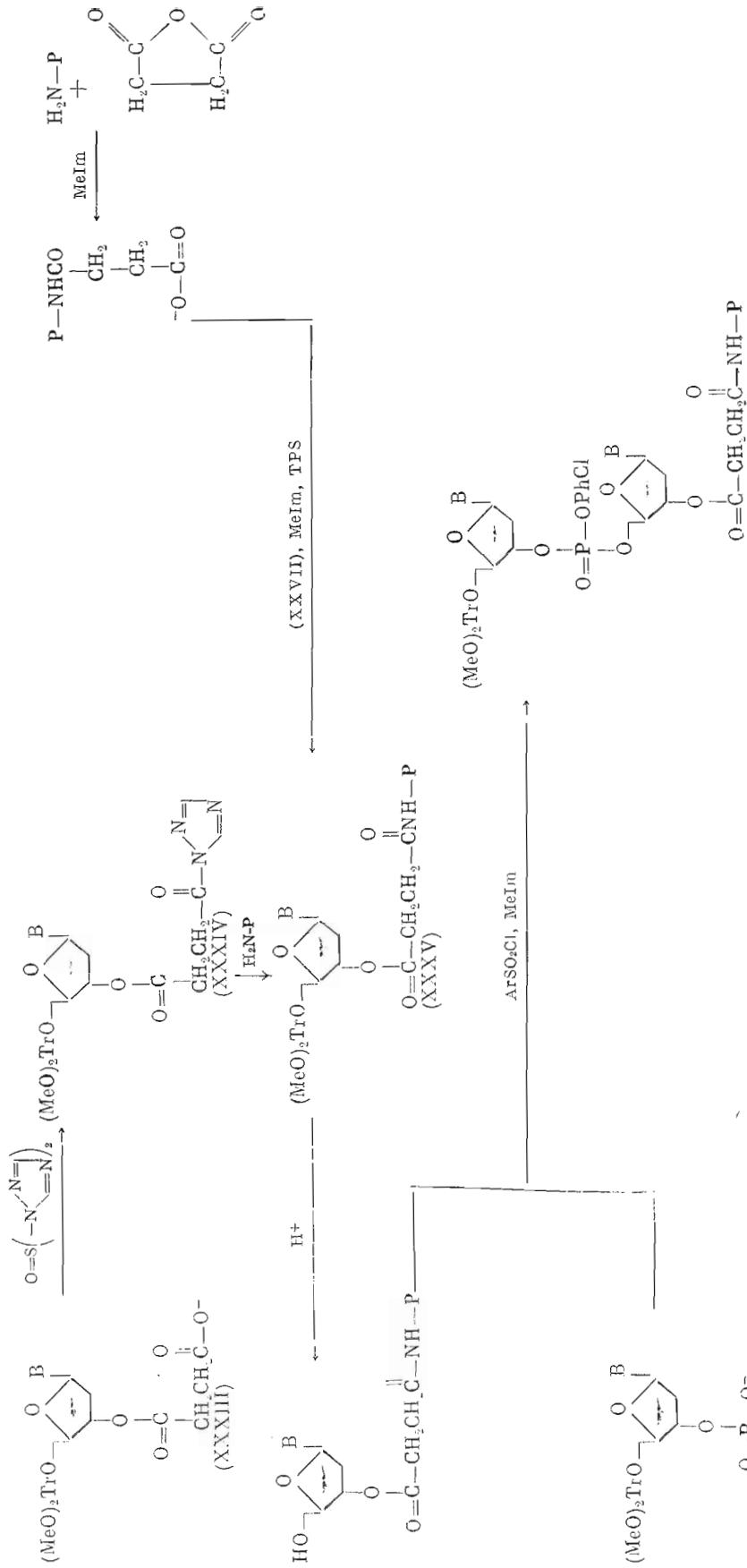
*** Нуклеотидный компонент (30 мкмоль) высушивали упариванием с растворителем, затем прибавляли раствор арилсульфохлорида (45–60 мкмоль) и N-метилимидазола (90–120 мкмоль) и реакционную смесь быстро прибавляли к полимеру. Первое время реакции дано для использования мезитиленсульфохлорида, второе — для использования триизопропилбензоисульфохлорида в качестве конденсирующего реагента.

тидов, когда соединения элюируются с колонки в соответствии с длиной цепи, причем последний пик, как правило, принадлежит целевому продукту. Разрешающая способность обращенно-фазовой хроматографии значительно выше, чем адсорбционной, и позволяет надежно отделять друг от друга полностью блокированные олигонуклеотиды близкой длины, а также очищать целевые соединения от побочных продуктов реакции, в частности от 5'-сульфонилированного нуклеозидного компонента.

Несколько соединений, представленных в данной работе, получали N-метилимидазолидным методом на полимерных носителях на основе стекла, силикагеля и полистирола. Первые два типа носителей относятся к ненабухающим полимерам, а третий тип — к набухающим. Наращивание полинуклеотидной цепи, как и в случае синтеза в растворе, проводилось с 3'- к 5'-концу олигомера последовательным присоединением к закрепленному на смоле 3'-концевому пуклеозиду, имеющему свободную 5'-гидроксильную группу,mono- и динуклеотидов со свободной 3'-фосфодиэфирной группировкой (XXIX) и (XXXII). На каждой стадии использовался 3–5-кратный избыток нуклеотидного компонента. Реакции конденсаций осуществлялись в присутствии 2-кратного избытка триизопропилбензоисульфохлорида (или мезитиленсульфохлорида) и 6-кратного избытка N-метилимидазола относительно нуклеотидного компонента. Условия проведения конденсаций и типичные циклы обработки полимеров приведены в табл. 3. Во всех случаях была применена разработанная нами ускоренная процедура синтеза, при которой все реакции на полимерах проводились в одном растворителе [2].

Для присоединения первого нуклеозида к носителю наряду с ранее описанными способами [16–18] использовались реакции, позволившие значительно ускорить посадку первого звена на полимеры. Так, для присоединения нуклеозида к мерриффилдовскому полистиролу (2% сшивки дивинилбензолом), модифицированному аминометильными группировками [19], была использована реакция взаимодействия аминофункций полимера с триазолидом 3'-моносукцинатного производного 5'-диметокситритилнуклеозида (схема 2). В отличие от работы [20] монотриазолид (XXXIV) получали *in situ* действием тионилдитриазола на соответствую-

Схема 2



P = полимер
 $\text{B} = \text{T}$, bzA , anC или iG

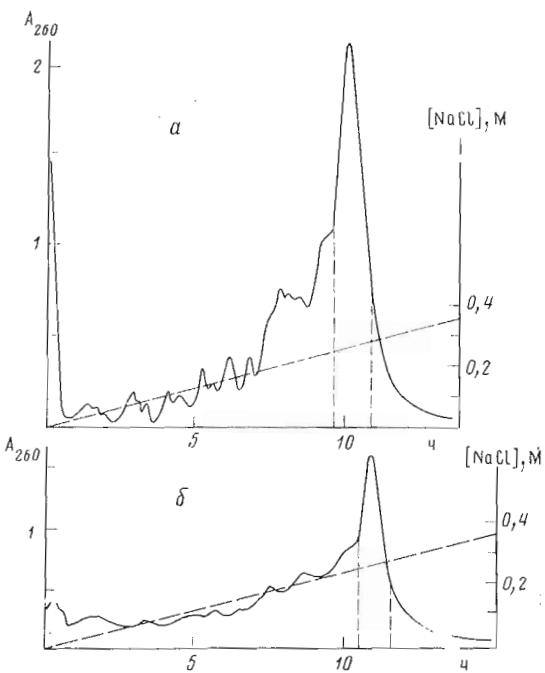


Рис. 2. Выделение олигонуклеотидов (XVIII) (а) и (XXII) (б) после удаления защитных групп анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (колонка 1,5×5 см) в градиенте концентрации хлористого натрия (рН 7,5), скорость элюции 40 мл/ч

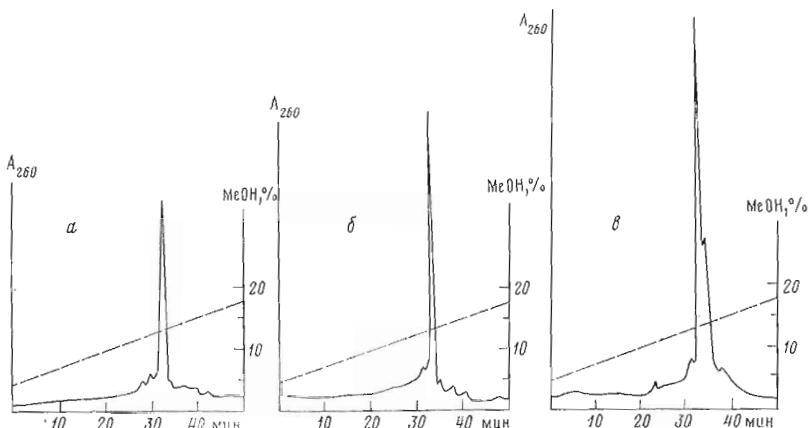


Рис. 3. Проверка гомогенности олигонуклеотидов (XVIII) (а), (XIX) (б) и (XXIV) (в) обращенно-фазовой хроматографией на колонке с сорбентом Zorbax C-8 (колонка 4×250 мм) в градиенте концентрации метанола в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин

щее производное нуклеозида (XXXIII) в диоксане. Это позволило сократить процедуру посадки нуклеозида на смолу по сравнению с ранее описанными способами [16] более чем в 10 раз при практическом количественном присоединении введенного в реакцию нуклеозида к полимеру.

Функционализация аминированных носителей на основе стекла и силикагеля проводилась в две стадии. Первоначально в полимеры вводились сукцинильные группировки обработкой янтарным ангидридом в пиридине, а затем к ним присоединялся 5'-диметокситритилнуклеозид в присутствии триизопропилбензольсульфонхлорида и N-метилимидазола в ацетонитриле, как это показано на схеме 2. В отличие от ранее предложенной методики посадки в присутствии дациклогексилкарбодиимида, при которой реакция завершается через 2 сут с невысоким выходом [17], предлагаемая мето-

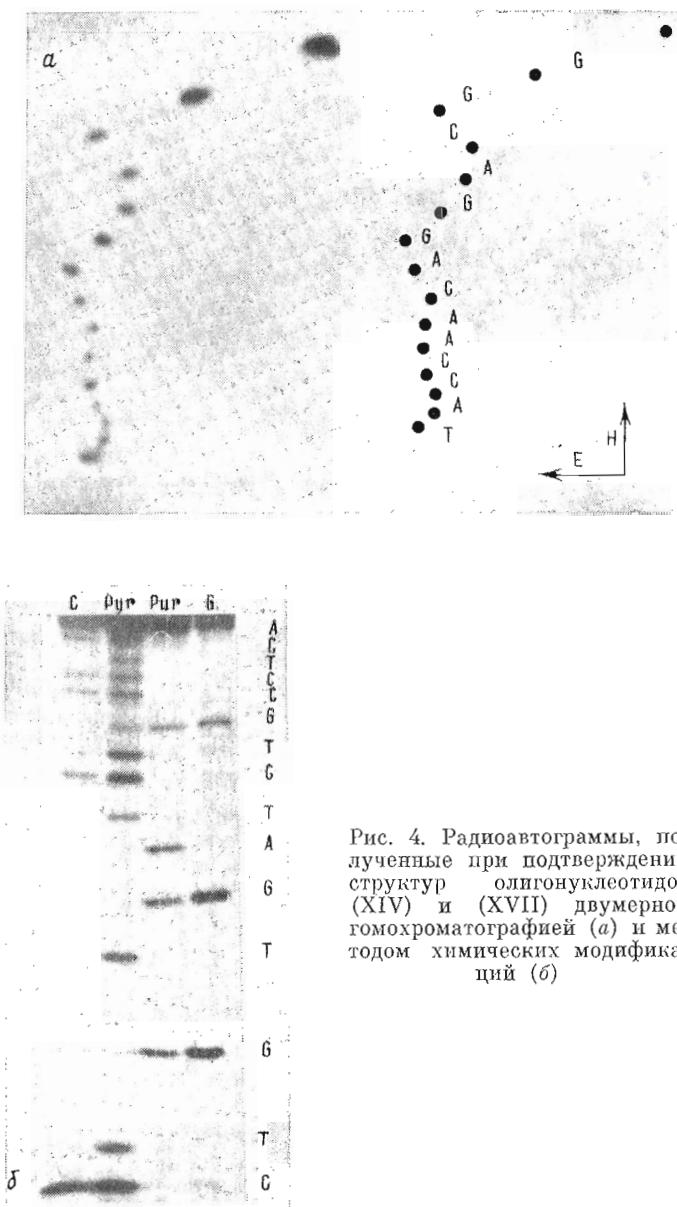


Рис. 4. Радиоавтограммы, полученные при подтверждении структур олигонуклеотидов (XIV) и (XVII) двумерной гомохроматографией (а) и методом химических модификаций (б)

дика сокращает время посадки до 1 ч при практическом количественном превращении всех активных центров на полимере.

Удаление диметокситритильной группы после каждого цикла наращивания осуществляли действием раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле или хлороформе (хлористом метилене), содержащем 25% ацетонитрила, в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Как показали контрольные эксперименты (см. табл. 2), в этих условиях при количественном удалении диметокситритильной группы с носителя наблюдалось практически полное отсутствие апуринизации, в частности разрыва N-гликозидной связи 3'-блокированных производных N-бензоилдезоксиаденоцинина.

Непрореагировавшие 5'-гидроксильные группы на полимере после проведения очередной реакции конденсации закрывались обработкой 10% раствором уксусного ангидрида в присутствии N-метилимидазола. Было установлено, что при проведении ацетилирования в присутствии 2,5–10% N-метилимидазола в растворе реакция заканчивается менее чем за 1 мин независимо от природы растворителя (хлороформ, хлористый метилен,

Таблица 4

Блокирование гидроксильных групп нуклеозидов 10% раствором уксусной кислоты в присутствии N-метилимидазола

Исходное соединение *	Растворитель	Время (с) полного прохождения реакции ацетилирования ** в присутствии N-метилимидазола, %				
		0,5	1	2	5	10
dT ⁺ T(Bz)	Ацетонитрил	120	60	30	15–20	10–15
dT ⁺ T(Bz)	Нитрометан	120	60–70	30	20	15
dT ⁺ T(Bz)	Хлороформ	150	70–80	40	20–30	15–20
dT ⁺ T(Bz)	Диоксан	150	90	45	20–30	15–20
[(MeO) ₂ Tr]T	Ацетонитрил	300	180	120	90	45
dT-P _g	»	—	600	—	180	120
dibG-P _{ps}	Хлороформ	—	600	—	210	180

* Знак \perp – трехэфирный фосфат, P_g, P_{ps} – см. примечание к табл. 1.

** Время прохождения реакции в растворе для соединений dT⁺T(Bz) и [(MeO)₂Tr]T определяли с помощью ТСХ на силикагеле. Отбор проб производили через 5–10 с, реакция терминировалась прибавлением метанола. Для оценки скорости ацетилирования на полимерных носителях аликоты ацетилированных полимеров (20–30 мг) отбирали через каждые 30 с, смолу промывали, высушивали и подвергали обработке избыtkом [(MeO)₂Tr]Tr(ClPh) в присутствии конденсирующего реагента (см. примечание к табл. 3). После промывки определяли содержание диметокситритильных групп в полимерах. В таблице указано время обработки уксусным ангидридом, после которого уже не происходило присоединения [(MeO)₂Tr]Tr(ClPh) к полимерному носителю.

ацетонитрил, нитрометан, тетрагидрофуран, пиридин и их смеси). Для прохождения той же реакции на полимерах требуется 3–5 мин (табл. 4).

Как можно видеть из табл. 3, на каждый цикл обработки полимеров затрачивается не более 25–35 мин, что значительно меньше, чем при использовании ранее описанных процедур [21, 22]. Скорость олигонуклеотидного синтеза на ненабухающих полимерах несколько выше, чем на полистироле. Для работы с последним носителем использовался реакционный сосуд, подобный описанному в работе [22]; синтез на силикагеле и стекле проводился либо в специальном шприце [23], либо в небольшой колонке, как описывалось ранее [2, 21]. В этих условиях на синтез 15–16-звенного олигомера исходя из моно- и динуклеотидов требуется около 5–6 ч.

Удаление защитных групп после окончания их химического синтеза в растворе проводилось в несколько этапов. Прежде всего элиминировались n-хлорфенильные группы с межнуклеотидных фосфатов. Для этого использовалась ранее описанная обработка аммиаком в водно-диоксановом растворе [2, 15], а также обработка 20% раствором пиперидина в водном пиридине. Как показали контрольные эксперименты, последний реагент практически не затрагивает ацильный остаток, блокирующий 3'-концевой гидроксил олигонуклеотида, и в слабой степени удаляет N-защитные ацильные группы. В то же время полное удаление индивидуальной межнуклеотидной n-хлорфенильной группы под действием пиперидина, как было установлено с помощью ТСХ на силикагеле и ³¹P-ЯМР-спектроскопии, протекает практически количественно за 3 ч при 50°C или за 24 ч при комнатной температуре. Действие водного пиперидина на межнуклеотидные P-защитные группы в данном случае напоминает действие ранее предложенного для этих целей оксимат-иона [24], но в отличие от последнего пиперидин легко удаляется из реакционной смеси простым упариванием, что упрощает обработку реакции.

N-Защитные и 3'-О-бензоильные группы удалялись далее действием конц. аммиака, а 5'-диметокситритильная группа — кислотным гидролизом. Удаление синтезированных олигонуклеотидов с полимерных носителей и их деблокирование проводились подобным образом [2]. Деблокированные соединения выделялись анионообменной хроматографией (рис. 2) или препаративным электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, как описывалось ранее [15]. Индивидуальность синтезированных соединений доказывалась высокоэффективной жидкостной хроматографией под высоким давлением в режиме обращенной фазы на колонках с сорбентом Zorbax C-8 в градиенте концентрации метанола в 0,1 М растворе ацетата аммония

(рис. 3). После введения $5'$ - ^{32}P -метки структура полученных соединений подтверждалась методом нуклеотидных карт [25] или методом химических модификаций [26] (см. рис. 4).

Полученные результаты показывают, что недавно предложенный N-метилимидазолидный метод [2] может быть с успехом использован для синтеза разнообразных олигонуклеотидов как в растворе, так и на полимерных носителях. Сочетание предлагаемых способов фосфорилирования и образования фосфотриэфирной связи с обращенно-фазовой хроматографией промежуточных и конечных соединений позволяет при синтезе в растворе повысить реальные выходы целевых олигонуклеотидов по сравнению с выходами, обеспечиваемыми стандартным подходом, и надежно получать соединения с любым нуклеотидным составом с длиной цепи 16 и более мономерных звеньев. С другой стороны, применение данного метода к твердофазному варианту синтеза олигонуклеотидов позволяет значительно сократить время, затрачиваемое на синтез каждого соединения. Скорость синтеза при этом практически равна скорости фосфитного варианта твердофазного метода. Однако в отличие от последнего, где применяется наращивание только мономерами [17], N-метилимидазолидный метод, как и другие варианты фосфотриэфирного подхода, предусматривает блочный способ синтеза с использованием ди-, три- и более длинных олигонуклеотидов в качестве Р-компоненты межнуклеотидной конденсации, что расширяет границы возможностей метода. Проведение синтеза в одном растворителе позволяет до минимума сократить время, необходимое для завершения наращивания цепи, а также объем и ассортимент требующихся для этого высококачественных растворителей. Это унифицирует и значительно упрощает технологическую схему синтеза, особенно в его автоматическом варианте.

Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды (Sigma, США), мезитиленсульфохлорид, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, 4,4'-диметокситритилюксид, 1,2,4-триазол (Aldrich, Бельгия), акриламид, N,N-метиленбисакриламид для гель-электрофореза, 1-метилимидазол (Merck, ФРГ), силикагельные пластинки для TCX UV₂₅₄ (Eastman Kodak, США), силикагель для колоночной хроматографии Kieselgel 60 (Merck, ФРГ). В качестве полимерных носителей использовались силикагель для хроматографии под высоким давлением Porasil C (Waters, США), стеклянные шарики CPG/alkylamine controlled pore glass (Pierce, США), хлорметилированный полистирол (2% сшивки дивинилбензолом) (Reanal, ВНР).

Задищенные нуклеозиды синтезировали как описано в работе [2]. TCX на силикагеле проводили в системе хлороформ — метанол (19 : 1). Для удаления циантильной защитной группы полностью задищенные олигонуклеотиды обрабатывали 1 ч 2 М раствором триэтиламина в ацетонитриле (20 мл/ммоль) при 20°С.

Обращенно-фазовую хроматографию под высоким давлением осуществляли на приборах Du Pont Preparative HPLC System 830 (США) и Altex (США) с использованием сорбентов Zorbax C-8 (Du Pont, США) и Lichrosorb 10 RP18 (Merck, ФРГ).

Количество присоединенного к полимерному носителю нуклеозида и выходы на каждой стадии конденсации определялись спектрофотометрическим анализом отщепившегося диметокситритиила, как описано в работе [16].

$5'$ - ^{32}P -меченные препараты олигонуклеотидов получали как описано ранее [15]. Структуру ^{32}P -меченых олигонуклеотидов подтверждали фингерпринтированием по методу [25] или методом химических модификаций [26].

Введение аминофункций в полимеры и получение моносукцинатов $5'$ -диметокситритиинуклеозидов проводилось как описано ранее [16, 19].

Для определения скорости апуренизации нуклеозидов под действием кислот на полимерных носителях (см. табл. 2) навеску смолы (10–15 мг) с присоединенным к ней нуклеозидом помещали в кварцевую кювету, при-

бавляли 3 мл соответствующего раствора кислоты и измеряли оптическую плотность раствора при 280 нм на приборе Beckman (Mod. 35, США) через 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45 и 60 мин. Степень апуринизации вычисляли из разности полученных значений D_{280} с учетом коэффициентов молярного поглощения для bzA и ibG. В случае тритилсодержащих нуклеозидов первое измерение проводили после прекращения увеличения оранжевой окраски раствора, связанный с освобождением тритилкатаиона. Правильность полученных значений контролировали методом, описанным в работе [23].

Получение защищенных мононуклеотидов. Для получения n -хлорфениловых эфиров 5'-диметокситритилнуклеозидов 3–5 ммоль n -хлорфенилфосфодихлорида растворяли в 10 мл сухого пиридина и при охлаждении прибавляли эквимольное количество воды. Через 10–15 мин раствор полученного таким образом фосфориридинового производного (XXVI) быстро отфильтровывали от осадка хлоргидрата пиридина и прибавляли к 1 ммоль 5'-диметокситритилнуклеозида, предварительно высушенного упариванием с пиридином. Реакционную смесь концентрировали в вакууме вдвое и выдерживали 30–40 мин при 20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ на силикагеле. Затем при охлаждении до 0° С прибавляли 10 мл 1 М раствора триэтиламмонийбикарбоната. Полученную смесь выдерживали 5–10 мин при 20° С, прибавляли 100 мл 0,1 М раствора триэтиламмонийбикарбоната и продукт экстрагировали хлороформом (3×100 мл). Хлороформный раствор упаривали в вакууме.

Получение n -хлорфенил- β -дианэтилфосфатов нуклеозидов проводили как описано в работе [2].

Межнуклеотидные конденсации при синтезе олигонуклеотидов в растворе проводили как описывалось ранее [2, 15]. Полностью блокированные ди-гексануклеотиды выделяли хроматографией на силикагеле (50 мл/ммоль) в градиенте концентрации метанола (0–8%) в хлороформе, насыщенном водой. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, упаривали, остаток растворяли в хлороформе и осаждали гексапом. Осадок отделяли центрифугированием и высушивали в вакууме.

Выделение защищенных олигонуклеотидов обращенно-фазовой хроматографией проводили после предварительной очистки соединения на силикагеле или без последней. Олигонуклеотид (500–1500 ОЕ₂₈₀) растворяли в 50–100 мл стартового буфера при нагревании до 50° С и помещали на колонку (0,6×25 см) с сорбентом Nucleosil 30 C₁₈ (Macherey — Nagel, ФРГ) или аналогичным сорбентом. Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате триэтиламмония (рН 8,0) со скоростью 2–4 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, прибавляли хлороформ, после расслаивания полученной смеси собирали органическую фазу, упаривали в вакууме, остаток промывали эфиром и высушивали.

Присоединение первого нуклеозида к полимерам. а) Аминированный полистирол [19] (15 г, 1,0 мэкв./г) и 3'-моносукцинат нуклеозида (XXXIII) (1,5 ммоль) высушивали отгонкой с сухим диоксаном. В отдельной колбе к смеси 3 ммоль триазола и 2,2 ммоль триэтиламина в 10 мл диоксана прибавляли 1,8 ммоль хлористого тионила, осадок хлоргидрата триэтиламина отфильтровывали и полученный таким образом раствор тионилдитриазола прибавляли к сукцинату нуклеозида (XXXIII). Ход реакции контролировали ТСХ на силикагеле. Через 5–10 мин монотриазолид сукцината нуклеозида при перемешивании прибавляли к аминополимеру, предварительно набухшему в 20–30 мл диоксана. Реакционную смесь встраивали 10 мин при 20° С, смолу отфильтровывали, промывали диоксаном, пиридином и обрабатывали 20% раствором уксусного ангидрида в пиридине (100 мл) в течение 2 ч для блокирования испрореагировавших аминогрупп на смоче. Полимер с присоединенным к нему нуклеозидом отфильтровывали, промывали пиридином, метанолом и высушивали в вакууме. На полимер присоединилось до 90–95% введенного в реакцию нуклеозида (0,08–0,085 ммоль/г).

б) 1 г аминированного силикагеля (~0,08 ммоль аминогрупп/г) или стеклянных шариков (0,1 ммоль аминогрупп/г) в 5 мл сухого пиридина

обрабатывали 0,5 г (5 ммоль) янтарного ангидрида в присутствии 425 мкл (5 ммоль) N-метилимидазола в течение 10–15 ч при 20° С. Смолу отфильтровывали, промывали пиридином, 50% водным пиридином, снова пиридином, метанолом, эфиром и высушивали. Полученный сукцинилированный полимер и 0,3 ммоль 5'-диметокситритиленуклеозида высушивали упариванием с ацетонитрилом, затем прибавляли 5 мл сухого ацетонитрила, 0,3 ммоль триизопропилбензольсульфохлорида и 0,9 ммоль N-метилимидазола. Через 1 ч прибавляли 0,2 мл абс. этанола, выдерживали 15 мин и смолу отфильтровывали, промывали последовательно ацетонитрилом, хлороформом, метанолом, эфиром и высушивали в вакууме. Полученные носители содержали 0,05–0,08 ммоль нуклеозида/г силикагеля при 0,07–0,09 ммоль нуклеозида/г стекла.

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводился в основном как описано в работе [2]. Последовательность операций и количества реагентов приведены в табл. 3.

Удаление защитных групп с целевых олигонуклеотидов проводили последовательной обработкой смесью конц. аммиак — диоксан (1:1) в течение 1 сут при 20° С или 20% раствором пиперицина в 20% водном пиридине в течение 3–5 ч при 50° С. После упаривания в вакууме сухой остаток растворяли в конц. аммиаке и выдерживали 3 сут при 20° С. Аммиак удаляли упариванием в вакууме, остаток обрабатывали 15 мин 80% уксусной кислотой и снова упаривали. Отщепление олигонуклеотидов от носителей и удаление с них защитных групп проводилось аналогично.

Выделение целевых олигонуклеотидов после удаления защитных групп осуществляли анионообменной хроматографией или гель-электрофорезом так, как это описывалось в работах [2, 16].

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Riggs A. D. *Science*, 1980, v. 209, № 19, p. 1401–1405.
2. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 21, p. 6675–6694.
3. Goeddel D. V., Leung D. W., Dull T. J., Gross M., Lawn R. M., McCandliss R., Seeburg P. H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P. W. *Nature*, 1981, v. 290, № 5801, p. 20–26.
4. Devos R., Cherouatre H., Taya Y., Degrave W., van Heuverswyn H., Fiers W. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 8, p. 2487–2501.
5. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 12, p. 5463–5467.
6. Wallace R. B., Johnson M. J., Suggs S. V., Miyoshi K., Bhatt R., Itakura K. *Gene*, 1981, v. 16, № 1, p. 21–26.
7. Овчинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Царев С. А., Ходкова Е. М., Монастырская Г. С., Ефимов В. А., Чахмажчева О. Г., Соловьев В. Д., Кузнецов В. П., Кавсан В. М. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 3, с. 725–728.
8. Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S. H., Baj-Bhandary U. L., Khorana H. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 11, p. 6744–6748.
9. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмажчева О. Г., Долганов Г. М.; Ревердатто С. В. *Биоорганская химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1682–1692.
10. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. *Tetrahedron Lett.*, 1982, v. 23, № 9, p. 961–964.
11. Narang S. A., Brousseau R., Hsiung H. M., Michniewicz J. J. *Methods in Enzymol.*, 1980, v. 65, part I, p. 610–620.
12. Jones S. S., Reese C. B., Sibanda S., Ubasawa A. *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, № 47, p. 4755–4758.
13. Грайфер Д. М., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Резвухин А. Н. Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 3, с. 616–619.
14. Letsinger R. L., Ogilvie K. K. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 12, p. 3350–3355.
15. Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чахмажчева О. Г. *Биоорганская химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 231–238.
16. Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K. *Nucl. Acids Res.*, 1980, v. 8, № 22, p. 5507–5517.
17. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185–3191.
18. Gough G. R., Brunden M. J., Gilham P. T. *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, № 42, p. 4177–4180.
19. Mitchell A. R., Erickson B. W., Ryabster M. N., Hodges R. S., Merrifield R. B. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1976, v. 98, № 23, p. 7357–7362.

20. Добрынин В. Н., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 138–140.
21. Gait M. J., Matthes H. W. D., Singh M., Titmas R. C. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, p. 37–40.
22. Ito H., Ike Y., Ikuta S., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1755–1769.
23. Tanaka T., Letsinger R. L. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 10, p. 3249–3260.
24. Reese C. B., Ubasawa A. Nucl. Acids Symp. Series № 7, 1980, p. 5–21.
25. Tu C. D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. Anal. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 73–93.
26. Maxim A. M., Gilbert W. Methods in Enzymol., 1980, v. 65, p. 499–560.

Поступила в редакцию
12.IV.1983

USE OF N-METHYLMIDAZOLIDE PHOSPHOTRIESTER METHOD FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES USEFUL IN RECOMBINANT DNA STUDIES

EFIMOV V. A., BURYAKOVA A. A., REVERDATTO S. V.,
CHAKHMAKHCHEVA O. G.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The chemical synthesis of 24 oligodeoxyribonucleotides, which are specific primers, molecular probes, linkers, adaptors for the identification, cloning and expression of some DNA fragments, is described. The synthesis was carried out by the rapid N-methylimidazolide phosphotriester method in solution and on solid phase. Three types of polymer supports – polystyrene, pore glass and HPLC grade silica gel, were used. Some improvements in phosphotriester method, such as the removing of 5'-dimethoxytrityl blocking group from oligomers in the synthetic process, deblocking of the final oligonucleotides, the attachment of the first nucleoside to solid phase and the isolation of the fully protected compounds in solution variant of the synthesis, are suggested.