



УДК 547.963.32.05:577.113.6

ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ ТВЕРДОФАЗНЫЙ ТРИЭФИРНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С АКТИВАЦИЕЙ ФОСФАТНОГО КОМПОНЕНТА НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

Горн В. В., Зарытова В. Ф.

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Ярмолинская Е. В.

Новосибирский государственный университет

Осуществлен твердофазный синтез 9 олигодезоксирибонуклеотидов длиной 6–14 звеньев в направлении как 3'→5', так и 5'→3' с активацией фосфатного компонента, связанного с полимерным носителем. В качестве конденсирующего реагента использована смесь триизопропилбензолсульфохлорида с N-метилимидазолом, деблокирование защитной 2-цианэтильной группы проводили смесью триэтиламина с ацетонитрилом. Время, необходимое для одного цикла наращивания цепи, 2,5 ч. Исследованная схема является достаточно простой, эффективной и воспроизводимой и может быть рекомендована для автоматического синтеза олигонуклеотидов.

За последние годы были достигнуты значительные успехи в твердофазном триэфирном синтезе олигонуклеотидов. В большинстве работ синтез проводился по схеме, включающей поэтапное удаление диметокситритильной 5'-О-защитной группы ОН-компонента, присоединенного к полимерному носителю, и конденсацию 3'-фосфатной группы Р-компонента, находящегося в растворе, с 5'-оксигруппой ОН-компонента (схема 1). Очевидными преимуществами этой схемы являются легкость удаления диметокситритильной группы и возможность простой спектрофотометрической оценки выхода на стадии конденсации. К недостаткам данной схемы можно отнести возможность сульфонирования 5'-оксигруппы ОН-компонента, а также апуринизации аденинсодержащих олигонуклеотидов при снятии диметокситритильной защитной группы действием кислоты. Использование для деблокирования кислот Льюиса в твердофазном методе синтеза пока имеет целый ряд ограничений [1].

Альтернативная схема, включающая конденсацию фосфатной группы Р-компонента, присоединенного к полимеру, с оксигруппой нуклеозидного компонента в растворе и поэтапное удаление 2-цианэтильной Р-защитной группы растущей цепи, может осуществляться в двух вариантах, основанных на использовании 3'- либо 5'-фосфатов нуклеотидов (схемы 2 и 3 соответственно).

Схема 1

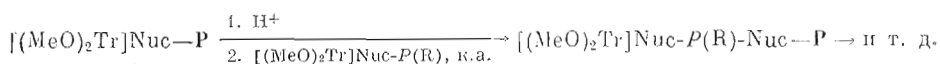
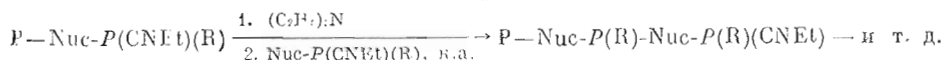
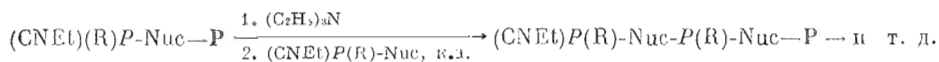


Схема 2



Принятые сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил, TPS — триизопропилбензолсульфохлорид, MeIm — N-метилимидазол, CNEt — 2-цианэтил, Lev — леулинил, МКХ — микроколоночная хроматография, ∓ — межнуклеотидная группа, содержащая *n*-хлорфенильный остаток. Префикс «d» (дезокс) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.



P — полимерный носитель с якорной группой, Nuc — защищенный по основанию

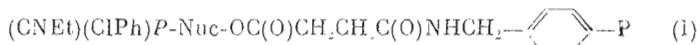
нуклеозид, $\text{R} = -\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$, $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})-\text{SCH}_3$, к. а. — конденсирующий агент.

Из них до настоящего времени была опробована лишь схема 2 [2—4] с использованием в качестве конденсирующих реагентов арилсульфазолидов. Время конденсации составляло 2 ч для триизопропилбензолсульфотетразолида [2], 3 ч для *n*-толуолсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолида [3] и 18 ч для мезитилсульфотетразолида [4]. Использование арилсульфазолидов в схемах 2 и 3 существенно осложняет автоматизацию процесса вследствие того, что триэтиламин, применяемый после каждой стадии конденсации для деблокирования 2-дианэтильной группы растущей цепи, ингибирует стадию активации фосфата в присутствии использованных конденсирующих реагентов [5]. Поэтому, если после стадии деблокирования не весь триэтиламин будет удален с полимера, его остаток может снизить выход на стадии конденсации, что отражается на воспроизводимости синтеза. Остаток триэтиламина перед конденсацией удаляли двумя путями: многократным упариванием полимера с абс. пиридином [3, 4], что в значительной степени осложняет возможность автоматизации, либо тщательной промывкой полимера большим объемом пиридина [2]. Однако в последнем случае трудно достичь полной отмывки полимера от следов триэтиламина (из-за значительной сорбции последнего поверхностью полимера), поэтому здесь, очевидно, необходимо ввести дополнительную стадию промывки полимера перед конденсацией разбавленным раствором кислоты в абс. пиридине (например, 2% уксусной кислотой), а затем проводить окончательную промывку полимера абс. пиридином.

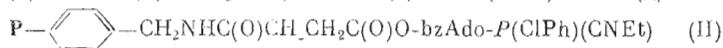
Недавно в качестве эффективного конденсирующего реагента для синтеза олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом была предложена смесь $\text{TPS} + \text{MeIm}$ [6—8]. С использованием данной смеси был осуществлен также твердофазный синтез длинных олигонуклеотидов по схеме 1 [9]. Реакция активации нуклеотидного компонента в присутствии $\text{TPS} + \text{MeIm}$ не ингибируется основаниями, более того, основания, например триэтиламин, могут быть использованы для ускорения реакции [8]. Поэтому можно было предположить, что использование смеси $\text{TPS} + \text{MeIm}$ в твердофазном синтезе олигонуклеотидов по схемам 2 и 3 позволит не только увеличить скорость синтеза по сравнению с арилсульфазолидами, но и повысить воспроизводимость процесса, а следовательно, и его пригодность для автоматизации.

В настоящей работе исследована возможность твердофазного синтеза олигонуклеотидов с активацией фосфатного компонента на полимере исходя из *n*-хлорфениловых эфиров 3'- и 5'-нуклеотидов (схемы 2 и 3) с использованием в качестве конденсирующего реагента смеси $\text{TPS} + \text{MeIm}$.

В качестве носителя был использован полистирол, радиационно привитый на поверхность политетрафторэтилена [10], с бензиламиными якорными группами [11], содержащий 120 мкмоль бензиламина на 1 г носителя. Первое нуклеотидное звено присоединяли к полимеру через остаток янтарной кислоты аналогично тому, как описано в работе [12]. Было синтезировано шесть образцов полимера с различными нуклеотидами (Ia—Iд, II). Количество введенного нуклеотида составляло во всех случаях 70—100 мкмоль на 1 г носителя.



$\text{Nuc} = \text{Thd}$ (а), bzAdo (б), anCyd (в), ibGuo (г), $\text{Thd}-(\text{ClPh})\text{P}-\text{Thd}$ (д)



Карта операций для одного цикла наращивания цепи на носителе

Операция	Растворители и реагенты	Объем, мл	Время, мин
Конденсация	ОН-компонент, TPS, MeIm, абс. пиридин	2	60
Промывка	Абс. пиридин	10	5
Деблокирование	TFA - CH ₃ CN (1:1)	5	90
Промывка	Абс. пиридин	15	5

Схема операций для одного цикла наращивания нуклеотидной цепи на полимере по схемам 2 и 3 приведена в табл. 1. Продолжительность цикла составляет 2,5 ч*.

При синтезе гексануклеотида А-С-А-С-А-С (IIIa) по схеме 3 оказалось, что выход на первой стадии конденсации, определенный методом МКХ, существенно ниже, чем выходы на всех остальных стадиях (45% против 80–90%). Такое снижение выхода было отмечено ранее для полистирольных носителей [11]. Мы попытались повысить выход на первой стадии следующим образом: полимер с присоединенным первым нуклеотидным звеном обрабатывали раствором TPS и MeIm в абс. пиридине до удаления 2-цианэтильной защитной группы (нулевая стадия). После такой обработки выход на первой стадии конденсации при синтезе гексануклеотида (IIIб) составил 80%, а общий выход гексануклеотида повысился с 10,5 до 14,5%.

Далее этот же гексануклеотид (IIIв) был синтезирован по схеме 2. Выход на первой стадии составил 91%, а общий выход — 18%. Таким образом, можно сделать вывод, что эффективность синтеза по схемам 2 и 3 существенно не отличается и выбор направления синтеза должен в первую очередь определяться доступностью исходных защищенных мононуклеотидов.

По предложенной методике с проведением «нулевой стадии» было синтезировано еще шесть олигонуклеотидов (IV) — (IX), один из них — по схеме 2 и пять — по схеме 3; при синтезе ундекануклеотида (VI) использован полимер с присоединенным динуклеотидом. Условия синтеза и выходы продуктов приведены в табл. 2.

Для наращивания цепи использовали 2-цианэтил-*n*-хлорфениловые эфиры защищенных моно-, ди- и тринуклеотидов. Динуклеотиды типа (CNEt)(CPh)P-Nuc≡Nuc(Lev) и (MeOTr)Nuc≡Nuc-P(CPh)(CNEt), а также концевые блоки получали конденсацией соответствующих мононуклеотидов в хлороформе в присутствии смеси TPS+MeIm [6]. Левулильную защитную группу удаляли гидразингидратом [14], монометокситритильную — трихлоруксусной кислотой в хлороформе [15].

После завершения стадий конденсации носитель обрабатывали 0,3 М раствором *n*-нитробензальдоксимата лития для отщепления олигонуклеотида от полимера и удаления межнуклеотидных *n*-хлорфенильных защитных групп [4]. Деблокирование защитных групп гетероциклических оснований проводили конц. аммиаком при 50°С. Если олигонуклеотид содержал концевую монометокситритильную группу, ее удаляли 80% уксусной кислотой.

Выделение олигонуклеотидов проводили методом ионообменной хроматографии на колонке с аминсилохромом АС_{III}-300. На рисунке приведены профили микроколоночной хроматографии реакционных смесей после синтеза олигонуклеотидов (VI) и (IX).

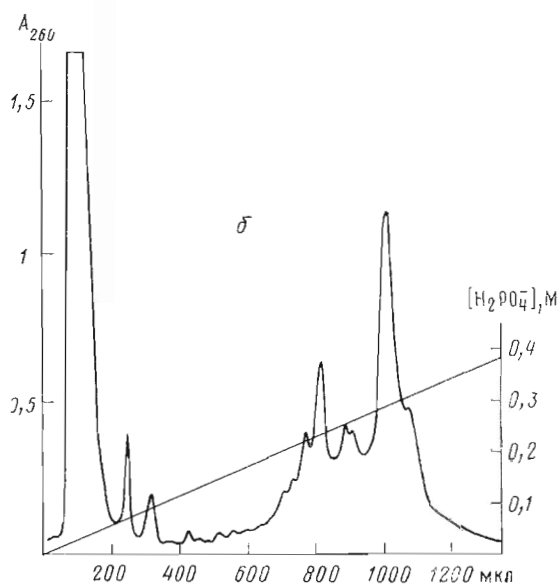
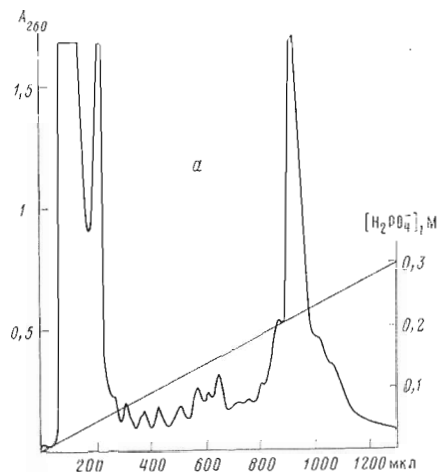
Гомогенность синтезированных олигонуклеотидов была подтверждена микроколоночной хроматографией на Partisil 10 SAX и электрофорезом

* Следует отметить, что это время может быть значительно сокращено за счет использования более эффективных реагентов для деблокирования 2-цианэтильной группы, например растворов гуанидина или тетраметилгуанидина в абс. пиридине [13].

Схемы синтеза, структура конечных блоков и выходы олигонуклеотидов (III) - (IX)

Олигонуклеотид	Схема наращивания цепи *	Схема синтеза	Полимер			Структура конечных блоков	Выход продукта		
			тип	емкость, ммоль/г	кол-во, мг		Объем	ммоль	%
A-C-A-C-A-C (IIIa)	2+1+1+1+1	3	Iв	70	250	(MeOTr)bzA≠anC	120	1,8	10,5
A-C-A-C-A-C (IIIб)	2+1+1+1+1	3	Iв	70	230	»	150	2,3	14,5
A-C-A-C-A-C (IIIв)	1+1+1+1+2	2	II	100	250	bzA≠anC(Lev)	300	4,6	48
pG-A-T-C-C-T-C-T-C-G-A-G-A (IV)	1+2+2+2+2+2+1	3	Iб	70	250	(CNEt) ₂ pibG	50	0,35	2
G-A-T-C-C-T-C-T-C-G-A-G-A (V)	3+2+2+2+2+2+1	3	Iб	70	160	(MeOTr)ibG≠bzA≠T	40	0,3	3
pC-C-C-T-C-T-T-T-C-T-T (VI)	3+2+2+2+2	3	Id	80	100	(CNEt) ₂ panC≠anC≠anC	170	1,65	26
pC-C-T-G-T-G-T (VII)	2+2+1+1+1	3	Ia	90	100	(CNEt) ₂ panC≠anC	48	0,75	9
C-C-A-A-G-C-T-T-G-G (VIII)	3+2+2+2+1	3	Ir	80	150	(MeOTr)anC≠anC≠bzA	40	0,1	1
A-G-C-T-T-C-T-C-G-A-G-A-G (IX)	1+2+2+2+2+2+3	2	II	100	220	ibG≠bzA≠ibG(Lev)	250	1,65	8

* Полуцирным шрифтом обозначен блок, присоединенный к носителю, курсивом — концевой блок.



Профили микроколоночной ионообменной хроматографии реакционных смесей на Partisil 10 SAX (колонка 1×50 мм, элюент — калий-фосфатный буфер, pH 7,1, скорость элюции 100 мкл/мин): *a* — undecanucleotide (VI), *б* — tetradecanucleotide (IX)

в полиакриламидном геле, а их первичная структура — методом нуклеотидных карт.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют сделать вывод о том, что схема твердофазного триэфирного метода синтеза с активацией фосфата на полимере при использовании данной комбинации конденсирующего и деблокирующего реагентов отличается достаточной простотой, эффективностью и воспроизводимостью и может быть рекомендована для автоматического синтеза олигонуклеотидов при использовании *n*-хлорфениловых эфиров как 3'-, так и 5'-нуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы *n*-хлорфениловые эфиры 3'-*O*-левулинил-*N*-ацилнуклеозид-5'-фосфатов, дицианэтиловые эфиры нуклеозид-5'-фосфатов и TPS отечественного производства, дезоксинуклеозиды (НИКТИ БАВ, Новосибирск), *N*-метилимидазол (Ega, ФРГ), носители для хроматографии аминосилором АС_{III}-300 (ИЦиГ СО АН СССР), Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция).

Защищенные нуклеозид-3'-фосфаты синтезированы аналогично описанному в работе [4].

Полистирольный носитель привитого типа получали как описано в работе [10]. Введение якорной бензиламиногруппы осуществляли по методике [11].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили в реакторе колоночного типа на установке «Виктория-1» отечественного производства в полуавтоматическом режиме, т.е. работой установки управляли с помощью пневмотумблеров при отключенном программаторе [2].

Микроколоночную хроматографию реакционных смесей осуществляли на хроматографе «Обь-4» отечественного производства.

Поглощение элюатов при препаративном выделении олигонуклеотидов регистрировали с помощью проточного денситомера Uvicord S (LKB, Швеция).

Введение первого нуклеотидного звена проводили аналогично методу, описанному в работе [12].

Нагрузку полимера по нуклеотиду определяли спектрофотометрически после отщепления нуклеотида с навески полимера конц. аммиаком в течение 12–15 ч при 50°С, причем учитывали только ту часть оптической плотности, которую имел пик с зарядом -1 (после МКХ-пробы на Partisil 10 SAX).

Проведение «нулевой стадии». Навеску полимера с присоединенным первым нуклеотидным звеном (100–250 мг) помещали в круглодонную колбу на 50 мл, добавляли 10 мл абс. пиридина и дегазировали полимер в вакууме водоструйного насоса в течение 1–2 мин. Затем переносили полимер в колонку-реактор объемом 1 мл и присоединяли вход и выход реактора к синтезатору.

Полимер промывали 10–15 мл абс. пиридина со скоростью 100 мл/ч, затем подавали через реактор 2 мл раствора TPS (0,6 ммоль) и MeIm (1,2 ммоль) в абс. пиридине. Через 1 ч отмывали полимер 10 мл абс. пиридина.

Удаление 2-цианэтильной защитной группы и проведение стадии конденсации. Через реактор с полимером пропускали 5 мл смеси триэтиламин – ацетонитрил (1:1) со скоростью 100 мл/ч и выдерживали полимер с этим раствором без перемешивания в течение 90 мин. Затем промывали полимер 10–15 мл абс. пиридина и подавали в реактор раствор 0,2 ммоль нуклеозидного компонента, 0,6 ммоль TPS и 1,2 ммоль MeIm в 2 мл абс. пиридина. Выдержав полимер с этим раствором в течение 60 мин без перемешивания, пропускали через реактор 10 мл абс. пиридина. Далее перечисленные операции повторяли необходимое число раз в соответствии с табл. 1.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов. Полимер с присоединенным олигонуклеотидом после проведения последней стадии конденсации обрабатывали в течение 20 ч при 20°С 2 мл 0,3 М раствора *n*-нитробензальдоксимата лития [4] в смеси пиридин – вода (1:1). Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре 50% водным пиридином (3×5 мл). Объединенный фильтрат упаривали, остаток растворяли в 10 мл воды, подкисляли каплей уксусной кислоты и экстрагировали 5 мл хлороформа. Водный слой упаривали и остаток обрабатывали 5 мл конц. аммиака 15 ч при 40°С. Раствор упаривали и, если олигонуклеотид содержал концевую монометокситриэтильную группу, остаток дополнительно обрабатывали 5 мл 80% уксусной кислоты в течение 48 ч при 20°С.

Выделение деблокированных олигонуклеотидов проводили на колонке с аминоксилородом AC₁₁₁-300 (1,8×30 см) в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера, pH 7,5 (0–0,2 М) в 30% ацетонитриле, объем градиента 1 л, скорость элюции 6 мл/мин. Фракции, содержащие нужный пик, обессоливали сначала на колонке с AC₁₁₁-300 (0,8×3 см, элюент – 1 М ТЕАВ), затем на сефадексе G-25 (1×30 см).

Выходы олигонуклеотидов приведены в табл. 2 в расчете на первый нуклеотид, считая экстинкцию олигомера равной сумме экстинкций соответствующих мономеров.

Последовательности нуклеотидов в синтезированных олигомерах подтверждены анализом по методу нуклеотидных карт.

Авторы выражают благодарность С. А. Грачеву за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ито Н., Ike Y., Ikula S., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1755–1769.
2. Потанов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова З. А., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 6, с. 1386–1389.
3. Амирханов Н. В., Кумарев В. П., Ривкин М. П., Рыбаков В. И. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 1, с. 126–129.
4. Свияжков А. П., Ломакин А. П., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 1, с. 490–497.
5. Зарытова В. Ф., Халимская Л. М., Ярмолинская Е. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1980, вып. 6, с. 78–86.
6. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Докл. АН СССР, 1982, т. 265, № 4, с. 878–881.
7. Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чихлаччева О. Г. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 2, с. 231–238.
8. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 5, с. 660–666.
9. Ejtov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6675–6694.
10. Potarov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
11. Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5507–5517.
12. Gait M. J., Sing M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 5, p. 1081–1095.
13. Гуманов Ю. В., Горн В. В., Потанов В. К., Шабарова З. А. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 5, с. 1130–1131.
14. Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1981, № 4, вып. 2, с. 131–138.
15. Gait M. J., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., Symposium Ser., 1980, № 7, p. 225–232.

Поступила в редакцию
27.IV.1983

SEMI-AUTOMATED SOLID PHASE PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES VIA ACTIVATION OF P-COMPONENT ON THE SUPPORT

GORN V. V., ZARYTOVA V. F., YARMOLINSKAYA E. V.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR; Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Solid phase phosphotriester synthesis of 9 oligodeoxyribonucleotides, 6–14 units long, was carried out both in 3'→5' and 5'→3' directions using the activation of P-component attached to a polymer support. Mixture of triisopropylbenzenesulphonyl chloride and N-methylimidazole was used as condensing reagent. 2-Cyanoethyl group of the growing oligonucleotide chain was removed with the mixture of triethylamine and acetonitrile. One cycle of chain elongation required 2.5 h. The investigated scheme is fairly simple, effective, reproducible, and can be recommended for automated oligonucleotide synthesis.