



УДК 547.963.32.057:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

IV. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ЭФФЕКТИВНОГО КОНДЕНСИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА *

*Ломакин А. И., Ястребов С. И., Горбунов Ю. А.,
Салужков В. В., Попов С. Г.*

*Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Колцово Новосибирской обл.*

Описан быстрый автоматический синтез на новом силикагельном носителе С-80 «Силохром» ундекатимидилата и трех олигодезоксирибонуклеотидов длиной 9–11 звеньев. Использование в качестве конденсирующего реагента смеси TPS и 4,N,N-диметиламинопиридин-1-оксида (DMAPO) позволяет сократить продолжительность стадий конденсации на полимерном носителе с использованием защищенных моно-, ди- и тринуклеотидных блоков до 2–6 мин. Одея цикл наращивания олигонуклеотидной цепи на установке «Виктория-2» занимает менее 30 мин и практически не зависит от длины защищенного блока.

Значительные успехи, достигнутые в синтезе олигонуклеотидов на полимерных носителях фосфотриэфирным способом, связаны с использованием в качестве конденсирующих реагентов различных арилсульфонильных производных тетразола и 3-нитро-1,2,4-триазола либо смесей арилсульфонилхлорида с этими азотистыми гетероциклами [2–5]. Время конденсации с использованием мономерных блоков в присутствии таких агентов составляло ~1 ч [3, 4], однако при переходе к ди- и тринуклеотидным блокам оно увеличивалось в 2–3 раза [2, 5, 6].

Использование в твердофазном методе синтеза в качестве конденсирующего реагента предложенной позднее смеси TPS (или MSNT) и N-метилпимидазола позволило сократить время конденсации с мономерными блоками до 15–20 мин [7, 8], однако продолжительность конденсации с применением ди- и тринуклеотидов составляла 0,5–2 ч [5, 9, 10].

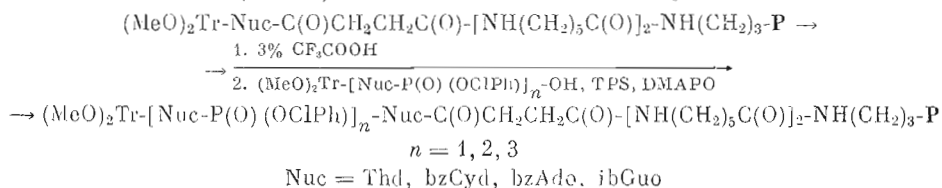
В связи с этим заслуживают внимания более эффективные конденсирующие реагенты, позволяющие сократить время конденсации на полимерном носителе не только с мономерами, но и с более длинными блоками. Недавно в нашей лаборатории было предложено использовать для образования межнуклеотидной связи смесь TPS и DMAPO, эффективность которой была продемонстрирована в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов [11]. В настоящей работе исследована возможность твердофазного синтеза олигонуклеотидов на установке «Виктория-2» с помощью защищенных моно-, ди- и тринуклеотидных блоков в присутствии смеси TPS и DMAPO как конденсирующего реагента.

В качестве полимерной основы был использован описанный нами новый носитель [1], полученный из силикагеля С-80 «Силохром», содержащего якорные аминопропильные группы, после двукратной обработки 6-N-диметокситриэтиламинокапроновой кислотой в присутствии MS и N-метилпимидазола и последующего присоединения защищенного нуклеозида с помощью смеси подходящего 5'-O-диметокситриэтилнуклеозид-3'-O-сукцината, MS и

* Сообщение III см. [1].

Принятые сокращения: ClPh – *n*-хлорфенил, MS – мезитиленсульфохлорид, TPS – триэтилопропилбензолсульфохлорид, MSNT – 1-(мезитиленсульфониль)-3-нитро-1,2,4-триазол, DMAPO – 4-N,N-диметиламинопиридин-1-оксид. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB. Префикс «d» (дезоксид) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

N-метилимидазола (схема). Количество введенного нуклеозида составляло



~100 мкмоль на 1 г носителя. Такая нагрузка позволила использовать в синтезе олигонуклосотидов небольшие количества носителя (25–40 мг) и сократить общее время промывок и отщепления $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ -защитной группы (табл. 4) на установке «Виктория-2» более чем в 1,5 раза по сравнению с описанным ранее [12].

Для парацивания олигонуклеотидной цепи использовали 0,1–0,15 М раствор защищенных моно-, ди- и тринуклеотидных блоков в абс. пиридине, активированных смесью TPS и DMAPO (схема). Избыток нуклеотидного компонента составлял 5–6 экв. в расчете на первый нуклеозид. Выходы на стадиях определяли по количеству диметокситритилкарбинола, содержащегося в объединенных элюатах операций 3–4 (табл. 1).

Для установления оптимального времени конденсации защищенных мононуклеотидов на полимерном носителе с использованием смеси TPS и DMAPO был проведен модельный эксперимент: навеску носителя, содержащего 4,9 мкмоль 5'-О-диметокситритилтимидина, помещали в реактор установки «Виктория-2» и проводили несколько циклов наращивания цепи с помощью $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{-Thd-P(O)(OCiPh)OH}$, активированного смесью TPS и DMAPO, уменьшая время каждой следующей конденсации. Выходы, определенные по количеству $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$, для стадий конденсации продолжительностью от 30 мин до 30 с приведены в табл. 2.

Результаты модельного эксперимента позволили предположить, что в синтезе олигонуклеотидов на полимерных носителях при использовании в качестве конденсирующего реагента смеси TPS и DMAPO в случае мономерных блоков оптимальным является время конденсации 2–3 мин*, а в случае ди- и тринуклеотидных блоков по аналогии с литературными данными [2, 5, 6] оно должно быть увеличено в 2–3 раза и составлять 4–9 мин.

Для проверки этого предположения на установке «Виктория-2» был синтезирован ундекатимидилат по схеме (табл. 3), включающей конденсацию защищенных моно-, ди- и тринуклеотидов. Последовательность и продолжительность операций аналогичны приведенным в табл. 1, кроме времени конденсации, которое составляло 2 мин для мономера, 5 и 3 мин для димера и 5 мин для тримера. Выходы на стадиях конденсации, определенные по $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$, были равны 86–92% для мононуклеотида, 89 и 78% для динуклеотида при продолжительности конденсации 5 и 3 мин соответственно и 85% для тринуклеотидного блока. Выход полностью деблокированного ундекатимидилата, определенный после ионообменной ВЭЖХ (рис. 1а), составил 28,4% (табл. 3).

Высокая эффективность использования в качестве конденсирующего реагента смеси TPS и DMAPO была подтверждена автоматическим синтезом трех олигодезоксирибонуклеотидов длиной 9–11 звеньев. С целью ускорения «нулевой» стадии, т. е. стадии присоединения первого нуклеозида к полимерному носителю, проводимой в реакторе автоматической установки непосредственно перед синтезом олигодезоксирибонуклеотида, мы использовали для активации карбоксильной группы защищенного нуклеозид-3'-О-сукцината смесь TPS и DMAPO (3 и 6 экв. соответственно в расчете на 5'-О-диметокситритилнуклеозид-3'-О-сукцинат). Продолжительность «нулевой» стадии в этом случае составляла 3–5 мин, а количество первого нуклеозида, определенное по диметокситритилкарбинолу, достигало 90–100 мкмоль на 1 г носителя. Дальнейшее наращивание цепи в синтезе

* После завершения настоящей работы в печати появились сообщения [14, 15], результаты которых (в частности, продолжительность конденсации на полимерных носителях с помощью смеси TPS и DMAPO) согласуются с нашими данными.

Карта операций для одного цикла наращивания цепи

№	Операции	Растворители и реагенты	Время, мин
1	Промывка	Пиридин	1,5
2	»	Хлороформ	3×1,5
3	Деблокирование	3% CF ₃ COOH в 1,2-дихлорэтано	2×1,5
4	Промывка	Хлороформ	3×1,5
5	»	Пиридин	1
6	»	Абс. пиридин	3×2,5
7	Конденсация	Защищенный нуклеотидный блок, TPS, DMAPO (1:3:7) в абс. пиридине	2-6

Таблица 3

Выходы на стадиях конденсации при наращивании цепи [(MeO)₂Tr]Thd-P(O)(OCiPh)OH в присутствии смеси TPS и DMAPO

Время, мин	30	10	5	3	1	0,5
Выходы по (MeO) ₂ TrOH, %	84	83	82	84	73*	63

* В соответствии с данными [13] повышение избытка нуклеотидного компонента в 2 раза (10-12 экв. в расчете на первый нуклеозид, закрепленный на носителе) позволило увеличить выходы на стадии конденсации продолжительностью 1 мин до 85%.

Таблица 3

Условия синтеза и выходы олигодезоксирибонуклеотидов

Олигонуклеотид	Схема наращивания цепи (3' → 5')	Иммобилизованный 3'-концевой нуклеозид		Выход олигонуклеотида после ВЭЖХ		
		емкость полимера, мкмоль/г	исходное кол-во, мкмоль	ОЕ ₂₆₀	мкмоль	% (на исходный нуклеозид)
TTTTTTTTTTT (I)	1+1+1+1+2+2+3	81	2,04	59	0,58	28,4
GATCTCAGC (II)	1+1+1+1+1+2+2	98	2,45	42	0,44	18,0
GCGTTCSTTC (III)	1+2+2+2+1+2	94	2,35	47	0,52	22,1
AATTGGATCAT (IV)	1+2+2+2+2+2	97	2,41	36	0,29	12,0

олигонуклеотидов (II)–(IV) осуществлялось с помощью защищенных моно- и динуклеотидных блоков (табл. 3). Последовательность операций одного цикла аналогична приведенной в табл. 1. Продолжительность конденсации с мононуклеотидными блоками составляла 3 мин, с динуклеотидами — 6 мин; средние выходы на стадию, определенные по (MeO)₂TrOH, были достаточно высоки — 80–86%. Отщепление синтезированных олигонуклеотидов от носителя и деблокирование основнотлабильных защитных групп осуществляли обработкой смесью конц. аммиака — пиридина (9:1, 16 ч при 45°С), диметокситригильную защитную группу удаляли с помощью 80% уксусной кислоты (20 мин при 20°С). Целевые продукты выделяли ионообменной ВЭЖХ (рис. 1) на колонке с носителем, полученным на основе силикагеля С-40 «Силохром» по аналогии с описанным методом [16], в градиенте калий-фосфатного буфера. Выделенные олигонуклеотиды обессоливали на колонке с Lichrosorb RP-18 в градиенте ацетонитрила (выходы приведены в табл. 3).

В условиях, использованных нами в синтезе олигонуклеотидов на установке «Виктория-2», продолжительность промывок и деблокирования диметокситригильной защитной группы в одном цикле наращивания цепи (табл. 1) составляет 22 мин и существенно превышает продолжительность стадий конденсации моно-, ди- и тринуклеотидных блоков с применением в качестве конденсирующего реагента смеси TPS и DMAPO (2–6 мин). Весь цикл наращивания олигонуклеотидной цепи на носителе занимает менее 30 мин и практически не зависит от длины защищенного нуклеотид-

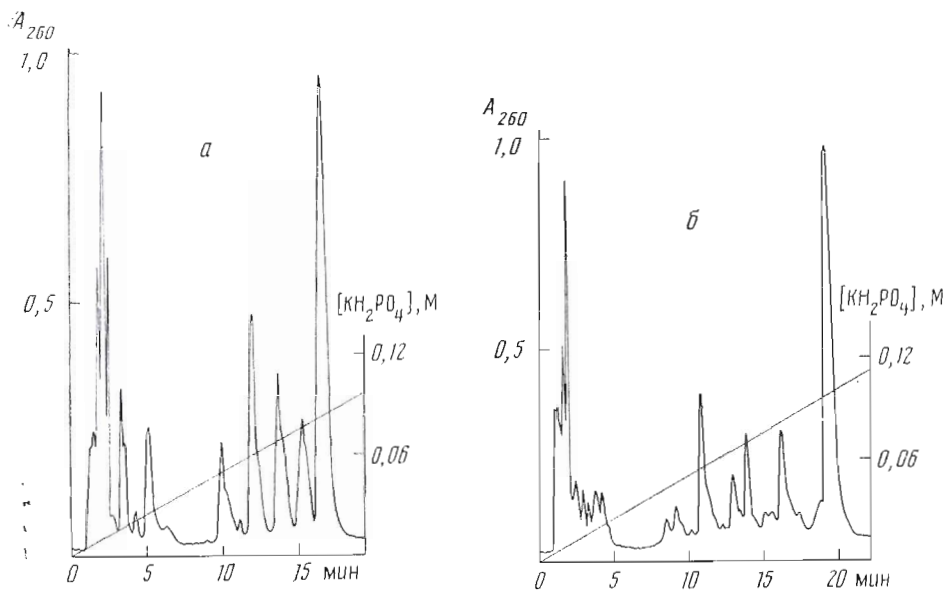


Рис. 1. Ионнообменная ВЭЖХ реакционных смесей, полученных в автоматическом синтезе олигодезоксирибонуклеотидов Т(рТ)₁₀ (I) (а) и GCGTTCCTC (III) (б) после удаления всех защитных групп. Градиент — 0,02–0,3 М КН₂Р₄ (рН 6,5) в 30% СН₃CN, скорость элюции 1,5 мл/мин

ного блока. Дальнейшего ускорения автоматического синтеза олигонуклеотидов на установке «Виктория-2» предполагается достичь путем уменьшения числа и продолжительности операций одного цикла наращивания цепи, например благодаря использованию во всех операциях цикла одного растворителя.

Предлагаемый нами быстрый фосфотриэфирный способ синтеза олигонуклеотидов на полимерном носителе имеет ряд преимуществ перед известным фосфитным способом при одинаковой продолжительности стадий конденсации [17]: 1) использование в фосфотриэфирном способе ди- и трипуклеотидных блоков позволяет синтезировать олигонуклеотиды быстрее, чем фосфитным способом, использующим, как правило, мономерные блоки; 2) исходные защищенные нуклеозидфосфатные блоки гораздо стабильнее и доступнее нуклеозидфосфитных блоков; 3) фосфотриэфирный способ синтеза допускает использование во всех операциях цикла наращивания цепи одного растворителя, что может привести к дальнейшему уменьшению времени одного цикла; 4) предлагаемый нами способ гораздо экономичнее, так как в нем используются небольшие избытки нуклеотидного компонента (5–6 экв. в расчете на первый нуклеозид), что в 3–4 раза меньше, чем в фосфитном способе синтеза олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск), силикагель С-80 марки «Силохром» отечественного производства, модификация которого описана в работах [1, 12]. 4-*N,N*-Диметиламинопиридин-1-оксид получали из 4-нитропиридин-1-оксида по известным методикам [18, 19]. Защищенные моно-, ди- и трипуклеотидные блоки получали по методу [20].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили в реакторе колончатого типа на установке «Виктория-2» (производство СКТБ СЭиАП СО АН СССР) с модифицированной гидравлической схемой [12] с помощью блока электронного управления.

Ионнообменную ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex (США), модель 322, на колонке (3,2×250 мм) с носителем, полученным на основе силикагеля С-40 «Силохром» по аналогии с описанным методом [16]. Для обессоливания использовали колонку (3,2×250 мм) с LiChrosorb RP-18 (Merck, ФРГ).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Perkin — Elmer 550 (США).

Цикл синтеза олигонуклеотидов (I)–(IV) на полимерном носителе. Навеску носителя (25 мг), содержащую 2–2,5 мкмоль 5'-О-диметокси-

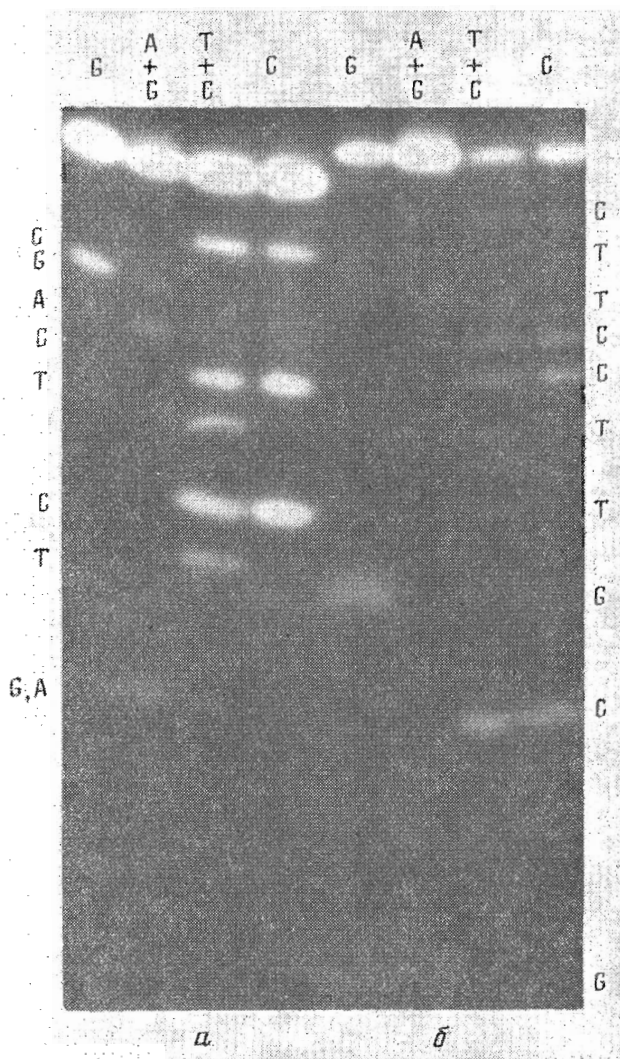


Рис. 2. Анализ последовательностей синтезированных олигонуклеотидов по методу Максама - Гилберта: *а* - GATCTCAGC (II), *б* - GCGTTCSTTC (III)

триптинуклеозида, помещали в реактор установки «Виктория-2». Через реактор пропускали растворители (хлороформ, пиридин, абс. пиридин) или 3% раствор CF_3COOH в 1,2-дихлорэтане со скоростью 100 мл/ч. Последовательность и продолжительность операций программировались с помощью блока электронного управления и указаны в табл. 1. Элюаты дегидратирующего раствора и следующего за ним хлороформа (операции 3-4, табл. 1) собирали для определения количества $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$ ($\lambda_{499} = 71700$ в смеси $\text{HClO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 3:2). Перед каждой операцией носитель освобождали от предыдущего растворителя (или раствора) пропуская через реактор сухой воздух в течение 10 с. После промывки носителя абс. пиридином и выдавливания растворителя воздухом в реактор с помощью шприца подавали 0,1-0,15 М раствор соответствующего нуклеотидного блока, ДМАРО (7 экв), предварительно высушенных азеотропным упариванием с абс. пиридином, и ТПС (3 экв.) в абс. пиридине (0,2-0,3 мл). Избыток нуклеотидного компонента в расчете на первое нуклеозидное звено составлял 5-6 экв. Носитель с этим раствором выдерживали, изредка встряхивая, 2-6 мин в зависимости от длины защищенного нуклеотидного блока. После этого повторяли перечисленные операции в соответствии с табл. 1.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов (I)–(IV). После проведения последней стадии конденсации в синтезе ундекатимидилата (I) носитель промывали в соответствии с табл. 1 (операции 1–5), а в синтезе олигонуклеотидов (II)–(IV) носитель промывали пиридином, затем обрабатывали смесью конц. аммиак – пиридин (9 : 1, 5 мл) в течение 16 ч при 45° С. Носитель отфильтровывали и промывали 5 мл 50% водного этанола и водой (2×3 мл). Объединенные фильтраты упаривали досуха и в случае олигонуклеотидов (II)–(IV) остаток после упаривания обрабатывали 80% уксусной кислотой (2 мл) в течение 20 мин при 20° С.

Деблокирование олигонуклеотиды (I)–(IV) выделяли понообменной ВЭЖХ в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера (0,02–0,3 М, рН 6,5) в 30% ацетонитриде. Фракцию, содержащую целевой продукт, обессоливали на колонке с Lichrosorb RP-18 в градиенте ацетонитрила (5–20%) в 0,05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере. Выходы синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 3.

Последовательность нуклеотидов в олигомерах (II)–(IV) подтверждена по методу Максама – Гилберта [21] (рис. 2).

Авторы выражают благодарность Н. К. Данилюк и Т. П. Артамоновой за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 213–219.
2. Tanaka S., Oshima T., Ohsuye K., Ono T., Mizono A., Ueno A., Nakazato H., Tsujimoto M., Higashi N., Noguchi T. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 6, p. 1707–1723.
3. Cait M., Mathes H. W. D., Singh M., Titmas R. C. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, № 1, p. 37–40.
4. Belagaje R., Brush C. K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6295–6303.
5. Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Orezkaja T. S., Kuprijanov E. A., Shabarov Z. A. Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 16, p. 1691–1694.
6. Амирханов Н. В., Ривкин М. И., Кумарев В. П. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 1008–1010.
7. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369–8387.
8. Mathes H. W. D., Zenke W. M., Crundström T., Starb A., Wintzerith M., Chambon P. EMBO J., 1984, v. 3, № 4, p. 801–805.
9. Gaffney B. L., Marky L. A., Jones R. A. Tetrahedron, 1984, v. 40, № 1, p. 1–3.
10. Ломакин А. И., Попов С. Г. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 927–933.
11. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Горбунов Ю. А., Самуков В. В., Попов С. Г. Химия природ. соединений, 1986, № 3, с. 386.
12. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920–926.
13. Patel T. P., Millican T. A., Bose C. C., Titmas R. C., Mock G. A., Eaton M. A. W. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 18, p. 5605–5620.
14. Ефимов В. А., Чухмакчева О. Г. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 8, с. 1087–1096.
15. Efimov V. A., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 10, p. 3651–3666.
16. Ястребов С. И., Попов С. Г. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 5, с. 661–669.
17. Letsinger R. L. In: Genetic engineering, principles and methods. N. Y.: Plenum Press, 1983, v. 5, p. 191–207.
18. Kaltritzky A. R., Randall E. W., Sultow L. E. J. Chem. Soc., 1957, № 4, p. 1769–1775.
19. Ochiai E. I. Org. Chem., 1953, v. 18, № 5, p. 534–551.
20. Сияжков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 490–498.
21. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.

Поступила в редакцию 30.IX.1985

После доработки 23.VI.1986

AUTOMATED SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES. IV. USE OF A NEW EFFICIENT COUPLING REAGENT

LOMAKIN A. I., YASTREBOV S. I., GORBUNOV Yu. A., SAMUKOV V. V., POPOV S. G.
All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region

A rapid automated synthesis on a new silica gel support C-80 has been described. Undecathymidilate and three oligodeoxyribonucleotides 9–11 units long were prepared using a mixture of TPS and 4-N,N-dimethylaminopyridine-1-oxide as a coupling reagent. Condensation time with this reagent is 2–6 min for protected mono-, di- and trinucleotide blocks and one synthetic cycle on «Victoriya-2» synthesizer takes about 30 min.