



УДК 547.963.32.057 : 542.95

© 1990 г.

*Т. Рейнтам, У. Мёллер, Т. С. Ореука,
З. А. Шабарова, А. И. Ломакин **

**ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С КОНЦЕВЫМИ
ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ ГИДРОФОСФОРИЛЬНЫМ МЕТОДОМ**

Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова;

** Всесоюзный научно-исследовательский яцурный институт Госагропрома
СССР, г. Владимир*

Гидрофосфорильный синтез олигодезоксирибонуклеотидов длиной 13—24 нуклеотида проводили на специально сконструированном полуавтоматическом синтезаторе. Продолжительность синтетического цикла не превышала 6 мин при эффективности синтеза 92—97% на стадию конденсации. До 30 ОЕ₂₆₀ чистого продукта было получено после выделения методом ВЭЖХ при проведении синтеза в масштабе 0,5—1,5 мкмоль.

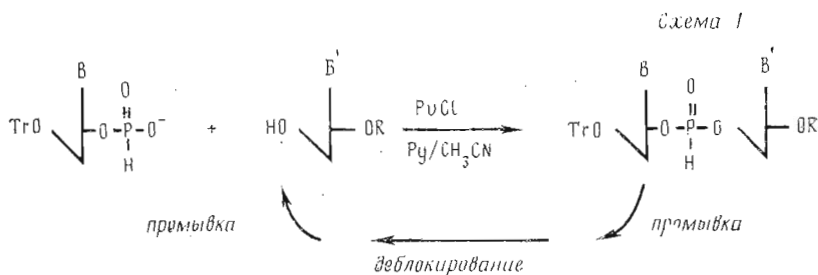
Для получения олигонуклеотидов с 3'- или 5'-концевыми фосфатными группами предложено использовать 2-[2-(4-метокситритилокси)этилсульфонил]этилфосфит, который вводится в стандартных условиях гидрофосфорильного синтетического цикла, а удаление фосфорилированных олигонуклеотидов с полимерного носителя и деблокирование концевой фосфатной группы не требует дополнительной обработки.

В настоящее время олигодезоксирибонуклеотидный синтез не имеет принципиальных ограничений по длине и первичной структуре синтезируемой ДНК благодаря использованию автоматических ДНК-синтезаторов и коммерческих наборов реагентов для синтеза. Однако из-за высокой стоимости и недостаточной гибкости ДНК-синтезаторов автоматический олигонуклеотидный синтез остается дорогим и не всегда доступным или целесообразным в лабораториях, использующих синтетические олигонуклеотиды.

В этой связи представляют интерес исследования, направленные на упрощение и удешевление синтетического процесса. Например, предложенный недавно гидрофосфорильный (Н-фосфонатный) метод синтеза олигонуклеотидов [1, 2] быстро приобретает популярность, так как по эффективности он сравним с распространенным амидофосфитным методом [3], но выгодно отличается от последнего экономичностью и высокой скоростью. Благодаря простоте синтетического цикла (схема 1) и значительной устойчивости растворов исходных нуклеотидных компонентов для гидрофосфорильного синтеза метод может быть использован в любом варианте, в том числе в ручном и полуавтоматическом.

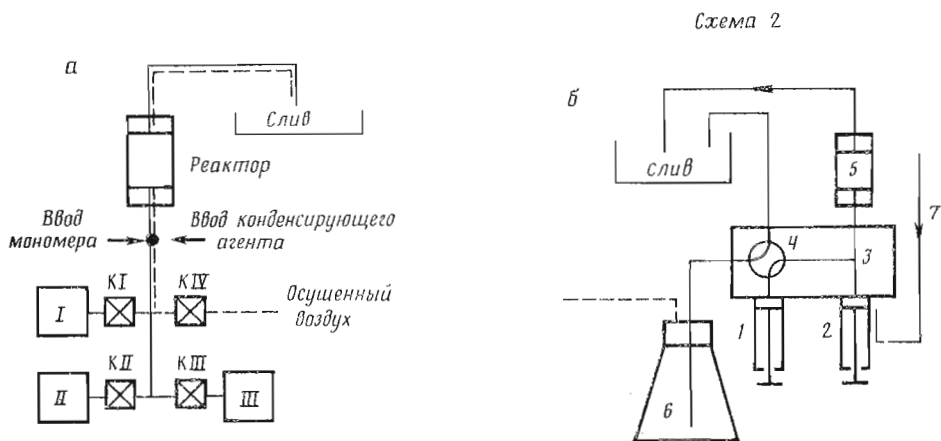
Для проведения гидрофосфорильного олигонуклеотидного синтеза был сконструирован полуавтоматический синтезатор, основу которого составили детали, применяющиеся в серийных отечественных ДНК-синтезаторах класса «Виктория». Минимальное количество этих деталей (по сравнению с автоматами «Виктория») делает полуавтомат (схема 2а) простым и обеспечивает надежность в эксплуатации.

Принятые сокращения: РvCl — пивалоилхлорид, Рv — пиридин; префикс «d» при обозначении дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.



где TrO = 4-монометокси- или 4,4'-диметокситритил, B, B' = T, bzA, bzC, ibG,
 $\text{R} = -\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$ полимер.

Синтетический цикл в гидрофосфорильном методе синтеза



I—III — сосуды с растворителями и растворами реагентов; KI — KIV — пневмоклапаны.

Сплошной линией указано направление движения жидкостей, пунктиром — направление движения осушенного воздуха.

1 — шприц для конденсирующего агента; 2 — шприц для нуклеозид-3'-фосфита; 3 — смеситель; 4 — кран; 5 — реактор с полимерным носителем; 6 — емкость для конденсирующего агента; 7 — магистраль промывочных растворов (устанавливается вместо шприца 2)

Установки, используемые для гидрофосфорильного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов (варианты а и б)

Основная трудность проведения синтеза олигонуклеотидов гидрофосфорильным методом в полуавтоматическом режиме связана с особенностью гидрофосфорильной конденсации, не допускающей преактивации нуклеотидного компонента конденсирующим агентом [1, 2, 4]. В автоматических синтезаторах это достигается тем, что в реактор с полимерным носителем подается смесь нуклеозид-3'-фосфита с конденсирующим агентом непосредственно после смешения последних (или смешение реагентов происходит в реакторе). Через 15—20 с реакционная смесь вытесняется из реактора свежей порцией нуклеотида и конденсирующего агента. Для создания подобного режима конденсации на полуавтоматической установке мы применяли подачу конденсирующего агента и нуклеотида из двух шприцев через смеситель, расположенный непосредственно перед входом в реактор с полимерным носителем (схема 2б). Скорость подачи растворов

Карта-схема операций синтетического цикла наращивания олигонуклеотидной цепи гидрофосфорильным методом

№	Операция	Растворители и реагенты	Время, с
1	Промывка	CH ₂ Cl ₂ или CH ₃ CN	30
2	Деблокирование	1% CF ₃ COOH или 3% CCl ₃ COOH в CH ₂ Cl ₂	40–60
3	Промывка	CH ₂ Cl ₂ или CH ₃ CN	30
4	»	Py/CH ₃ CN (1:1)	30–60
5	Конденсация	0,02 М нуклеозид-3'-фосфит и 0,1 М P ₄ Cl в Py/CH ₃ CN (1:1)	120
6	Промывка	Py/CH ₃ CN (1:1)	30–40

Примечания. Скорость потока при промывках не менее 2 мл/мин. Отмывку смесителя и заполнение шприца для конденсирующего агента проводили во время операции № 1 при помощи крана (см. схему 2а). Шприц для нуклеозид-3'-фосфита заполняли во время операции № 4 и устанавливали непосредственно перед конденсацией. При промывках реактор с полимерным носителем периодически продувался воздухом в течение 1–2 с.

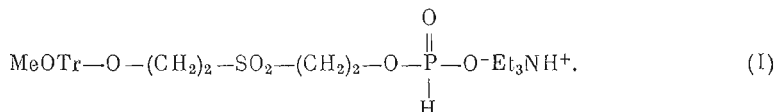
реагентов подбирали с таким расчетом, чтобы создать равномерный поток 2 мл активированной смеси через реактор в течение 90 с. Для осуществления остальных операций (карта-схема операций, таблица), в том числе для отмывки смесителя, вместо шприца для нуклеотида к смесителю присоединяли коллектор промывочных растворов.

Для синтеза использовали носители на основе силикагеля С-120, С-80 и пористого стекла МПС-1000, СРГ-500 [5]. Емкость составила 35–80 мкмоль нуклеозида на 1 г носителя. Синтез проводили на 15–25 мг носителя (0,5–1,5 мкмоль первого нуклеозида). В этих условиях по описанной выше схеме 1 был выполнен синтез около 40 олигодезоксирибонуклеотидов длиной 13–24 нуклеотида. Общий выход продуктов, определенный по тритил-катиону, варьировал от 26 до 55% в зависимости от длины олигонуклеотида, что соответствует эффективности синтеза 92–97% на стадию конденсации.

После окончания синтеза и окисления [1, 2] олигонуклеотид отщепляли от носителя и деблокировали экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований обработкой конц. NH₃. Полученную реакционную смесь, содержащую моно- или диметокситритилолигонуклеотид, анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ либо, после удаления тритильной группы, ионообменной или ион-парной ВЭЖХ. Типичные профили реакционных смесей и условия разделения представлены на рис. 1–4. Целевые продукты выделяли одним из вышеприведенных методов и хроматографировали на колонке С₁₈ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

При масштабе синтеза 0,5–1,5 мкмоль после двух хроматографий было выделено от 5 до 30 ОЕ₂₆₀ целевых продуктов с чистотой не менее 95%.

Как и другие методы олигонуклеотидного синтеза, гидрофосфорильный метод рассчитан на синтез олигодезоксирибонуклеотидов со свободными 3'- и 5'-гидроксильными группами. Коммерческие наборы реагентов и автоматические ДНК-синтезаторы значительно облегчают синтез таких «стандартных» олигонуклеотидов. Самым распространенным отклонением от стандартной структуры, пожалуй, является наличие у олигонуклеотида концевой фосфатной группы. Фосфорилированные олигодезоксирибонуклеотиды используются для сборки протяженных двухтяжевых фрагментов ДНК, а также в качестве промежуточных соединений при получении различных производных олигонуклеотидов [6–8]. В зависимости от задачи необходимо иметь 5'- или 3'-фосфорилированные олигонуклеотиды. Мы предлагаем общий метод получения фосфорилированных олигонуклеотидов по гидрофосфорильной схеме синтеза. Фосфорилирование как 3'-, так и 5'-конца олигонуклеотида проводят в рамках стандартного гидрофосфорильного цикла при помощи одного и того же соединения 2-[2-(4-метокситритилокси)этилсульфонил]этилфосфита (I):



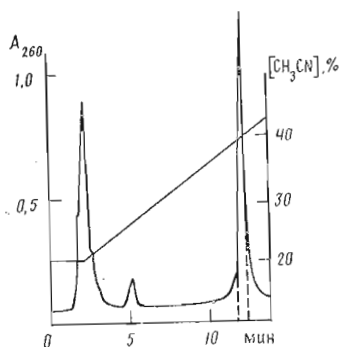


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, образующейся при синтезе $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{CTCGTAGATGCTCAG} \cdot \text{TGGGGCAT}$ на колонке ($250 \times 3,2$ мм) Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ). Элюция в градиенте ацетонитрила в 0,05 М ацетате триэтиламония (рН 7,0). Скорость потока 1 мл/мин

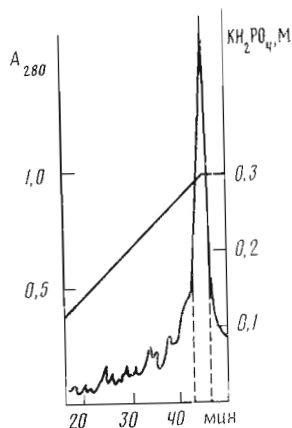


Рис. 2. Анионообменная ВЭЖХ реакционной смеси, образующейся при синтезе $\text{CTCGTAGATGCTCAGTGGGGCAT}$ на колонке ($250 \times 4,6$ мм) Полисил СА [14]. Элюция в градиенте концентрации фосфата калия в 30% ацетонитриле (рН 6,5). Скорость потока 1 мл/мин

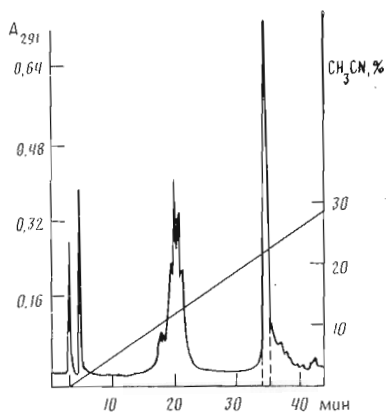


Рис. 3. Preparative обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, образующейся при синтезе олигодезоксирибонуклеотида $(\text{MeOTr})\text{ACCTCTG} \cdot \text{GCGGTGATAATGGATCCp}$ на колонке ($250 \times 4,6$ мм) Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ). Элюция в градиенте ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония. Скорость потока 1 мл/мин

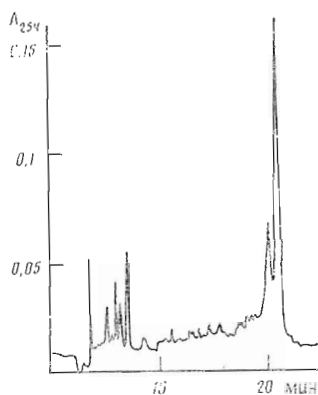
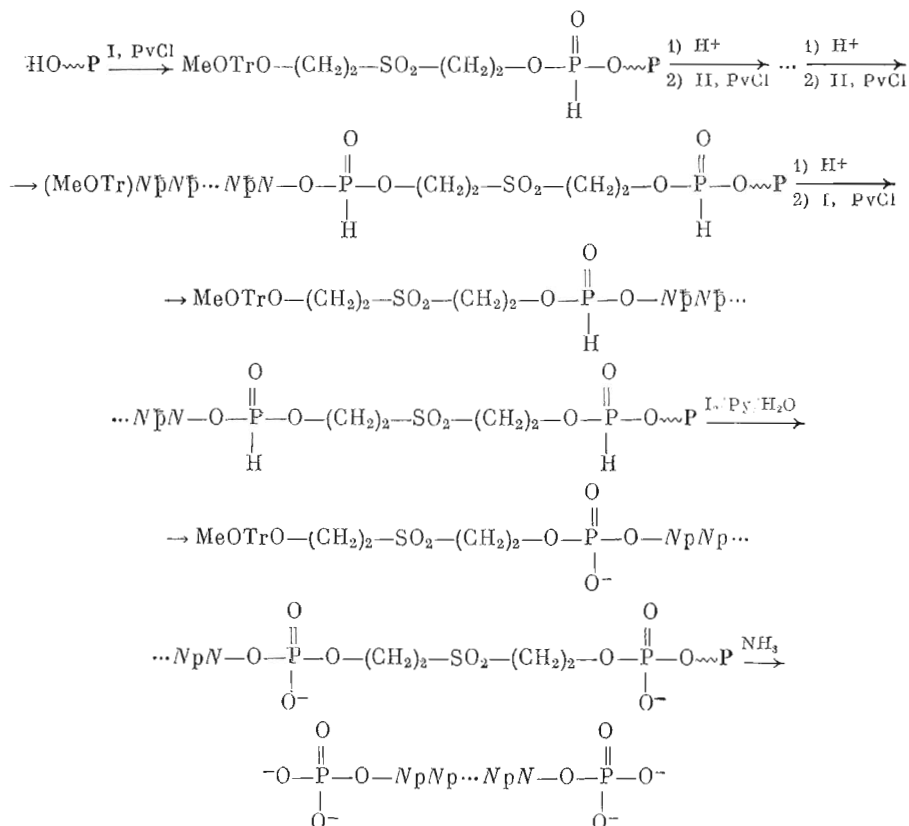


Рис. 4. Аналитическая непарная ВЭЖХ реакционной смеси, образующейся при синтезе олигодезоксирибонуклеотида pCCTGATAGCSTTTGTA на колонке ($250 \times 4,0$ мм) Армсорб С-16 (7,5 мкм, ИРЕА «Реахром», Ереван). Элюция в градиенте ацетонитрила в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7) с добавлением 2 мМ тетрабутиламмоний-катиона. Скорость потока 1 мл/мин

В качестве иллюстрации использования предлагаемого метода приведена схема синтеза 5'-, 3'-дифосфорилированного олигонуклеотида (см. схему 3). Соединение (I) мы синтезировали аналогично нуклеозид-3'-фосфитам. Этот фосфорилирующий агент может храниться в растворе готовым для применения (0,02 М в $\text{Pu}/\text{CH}_3\text{CN}$, (1 : 1)) длительное время (не менее 1 мес, как и нуклеозид-3'-фосфиты). Степень фосфорилирования можно контролировать спектрофотометрически по образующемуся при кислотной обработке монометокситридил-катиону. Для обеспечения количественного фосфорилирования, что особенно важно при синтезе протяженных олигонуклеотидов (фосфорилированный продукт по мере возрастания длины олигонуклеотида все труднее отделить от нефосфорилированного), синтетический цикл с фосфорилирующим агентом можно повторить.

Получение 5', 3'-дифосфорилированного олигонуклеотида
при помощи соединения (I)



(I) — 5'-O-(4-метокситритил)-N-ацил-2'-дезоксирибонуклеозид-3'-фосфит, $\ddot{\text{P}}$ — межнуклеотидная гидрофосфорильная группа, P — полимер.

Следует подчеркнуть, что метод ввиду его стандартности может быть использован не только в ручном и полуавтоматическом варианте, но и на автоматических олигонуклеотидных синтезаторах, которые имеют дополнительный сосуд для фосфорилирующего агента. Кроме того, при получении 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов синтез можно осуществлять на любом полимерном носителе, имеющем алифатические гидроксильные якорные группы, в том числе на носителях из стандартного набора для олигонуклеотидного синтеза.

Этим путем был синтезирован ряд олигодезоксирибонуклеотидов (11—24 звеньев) с концевыми фосфатными группами. Типичные профили реакционных смесей после твердофазного синтеза олигонуклеотидов с концевой фосфатной группой представлены на рис. 3, 4.

Суммируя опыт по полуавтоматическому гидрофосфорильному синтезу олигонуклеотидов, можно утверждать, что достигнутая эффективность и воспроизводимость не уступает аналогичным показателям для автоматических синтезаторов. При сравнении гидрофосфорильного метода с амидофосфитным видны явные преимущества первого при синтезе до 20-звенных олигонуклеотидов (отсутствие операции экзирования, короткий синтетический цикл, устойчивость и дешевизна исходных компонентов). При синтезе более длинных последовательностей целесообразность гидрофосфорильного метода ограничивается разрешающей способностью способа выделения целевого продукта.

Кроме того, полуавтоматический метод позволяет легко провести синтез «нестандартных» олигонуклеотидов, в том числе фосфорилированных, используя аналоги нуклеозид-3'-фосфитов, например 2-[2-(4-метокситри-

тилокси)этилсульфонил]этилфосфит, предложенный в данной работе, которые могут храниться в растворе, готовые к использованию длительное время.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-дезоксирибонуклеозиды отечественного производства, пивалоилхлорид (Sigma, США), трифторуксусную кислоту (Fluka, Швейцария). Салицилхлорфосфит синтезировали по методике [9], 5'-О-моно-(ди-)*n*-метокситритил-*N*-ацилдезоксирибонуклеозиды — по методике [10]. Модификацию полимерных носителей (С-80, С-120, МПС-1000, СРG-500) проводили как описано ранее [11, 12].

2'-[2-(4-Метокситритилокси)этилсульфонил]этилфосфит (I). 2,2'-Сульфонилдиэтанол (50 ммоль), высушенный переупариванием с абс. пиридином, растворяли в 50 мл абс. пиридина, прибавляли 4-монометокситритилхлорид (10 ммоль) и выдерживали 16 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 100 мл хлороформа и экстрагировали исходное трижды 50 мл 0,5 М триэтиламмонийбикарбонатного буфера (рН 7,5). Выход продукта после колоночной хроматографии на силикагеле в хлороформе 60%.

Тритилированный 2,2'-сульфонилдиэтанол (5 ммоль) высушивали переупариванием с абс. диоксаном, растворяли в 20 мл абс. диоксана и 3,5 мл *N*-метилморфолина. Добавляли 7,5 мл 1 М раствора салицилхлорфосфита в диоксане и перемешивали 15 мин. Затем прибавляли 3,5 мл H₂O и выдерживали 30 мин. Растворители упаривали. Остаток растворяли в хлороформе (200 мл), промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (100 мл), 100 мл 0,5 М триэтиламмонийбикарбонатного буфера (рН 7,5) и высушивали над Na₂SO₄. Хроматографическая очистка на силикагеле (градиент 0—20% EtOH в CHCl₃/Et₃N (99 : 1)) дала маслообразный продукт с выходом 90%. Структура продукта подтверждена методом ПМР-спектроскопии: δ, м. д. (J, Гц), CDCl₃: 1,26 (9H, т, J 7,32, —CH₃), 3,00 (6H, кв, J 7,21, CH₂—N), 3,26 (2H, т, J 5,75, S—CH₂), 3,39 (2H, т, J 5,8, S—CH₂), 3,59 (2H, т, J 5,8, O—CH₂), 3,75 (3H, с, O—CH₃), 4,26 (2H, м, J_{H,H} 5,8, J_{P,H} 7,65, CH₂—O—P), 6,83 (1H, д, J_{P,H} 626,21, P—H), 6,82 (2H, д, J 9, 3'- и 5'-H), 7,2 (2H, д, J 7,17, 4-H), 7,27 (6H, 2-, 6-, 2'-, 6'-H), 7,41 (4H, д, J 7,11, 3- и 5-H).

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов. После завершения наращивания цепи олигонуклеотиды окисляли 2% I₂ в Py/H₂O (98 : 2) в течение 15 мин. Олигонуклеотидный материал удаляли с полимера обработкой конц. NH₃ в течение 2 ч при 20° С. Удаление защит с гетероциклических оснований, а также β-элиминирование сульфэтильного остатка от фосфатной группы при синтезе олигонуклеотидов с концевыми фосфатными группами проводили аммонолизом в запаянной ампуле при 50—60° С в течение 12 ч. Аммиак упаривали, реакционную смесь освобождали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на биогеле P-2 (Bio-Rad, США). Реакционные смеси анализировали и выделяли при помощи ВЭЖХ (условия см. в подписях к рис. 1—4). Первичную структуру подтверждали твердофазным методом секвенирования [13].

Авторы выражают благодарность В. Н. Сергееву, В. Н. Ташлицкому, В. А. Бакановой за помощь при анализе, выделении и подтверждении первичной структуры олигонуклеотидов и Н. П. Потаповой за помощь при регистрации и интерпретации ПМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4054.
2. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
3. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis. A practical approach / Ed. Gait M. J. Oxford U. K.: IRL Press, 1984. P. 35—81.
4. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655—662.

5. Ломакин А. И. Исследование носителей и выбор оптимальных условий для автоматизированного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов: Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск: ВНИИМБ Минмедбиопрома СССР, 1988. С. 67-68.
6. Hsiung H. M., Sung W. L., Brousseau R., Wu R., Narang S. A. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 23. P. 5753-5794.
7. Соколова Н. И., Аширбекова Д. Т., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорганической химии. 1987. Т. 13. № 9. С. 1286-1288.
8. Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913-934.
9. Young R. W. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. № 8. P. 1672-1674.
10. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1316-1319.
11. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганической химии. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604-1611.
12. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Т. // Биоорганической химии. 1985. Т. 11. № 7. С. 920-926.
13. Rosenthal A., Jung R., Hunger H.-D. // Meth. Enzymol. 1987. V. 155. P. 301-331.
14. Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорганической химии. 1986. Т. 12. № 5. С. 661-669.

Поступила в редакцию
6.V.1989

После доработки
8.VIII.1989

T. REINTAMM, U. MÖLLER, T. S. ORETSKAYA, Z. A. SHABAROVA, A. I. LOMAKIN *

SEMI-AUTOMATIC SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES WITH TERMINAL PHOSPHATE GROUPS BY H-PHOSPHONATE APPROACH

M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemical Department;

** All-Union Foot and Mouth Disease Institute, Vladimir*

Oligodeoxynucleotides (13-24 mers) were synthesized by H-phosphonate approach using a specially constructed semiautomatic synthesizer. Total synthetic cycle time was less than 6 min and average yields per coupling step were 92-97%. Up to 30 OD₂₆₀ of pure products were obtained from 0,5-1,5 μmol scale synthesis after two-step HPLC purification.

To obtain 3'- or 5'-phosphorylated oligonucleotides, it is suggested to use 2-[2-(4-methoxytrityloxy)ethylsulfonyl]ethyl-H-phosphonate, which can be introduced under standard conditions of the H-phosphonate synthetic cycle and eliminated without any additional treatment.