



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.6:547.963.32.07

**КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ МЕТИЛИМИДАЗОМ  
БЫСТРЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ  
ФОСФОТРИЭФИРНЫМ ПУТЕМ НА СИЛИКАТЕЛЬНОМ НОСИТЕЛЕ  
В ДИХЛОРЕТАНЕ\***

*Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С.,  
Северцова И. В., Колосов М. Н.*

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

В последние годы было описано несколько эффективных методов твердофазного синтеза олигонуклеотидов фосфитным и фосфотриэфирным путем (см. [1–10] и цитированные там более ранние работы). Среди них фосфохлоридитные [1–4] и фосфамидитный [5] методы выгодно отличаются большой скоростью синтеза, но основаны на применении лабильных промежуточных веществ, получение которых в чистом виде и хранение требуют особых предосторожностей. При фосфотриэфирных методах [6–10], напротив, применяются легкодоступные и устойчивые мономеры и их блоки, однако межнуклеотидные конденсации протекают сравнительно медленно, что неудобно при массовом синтезе, а при применении автоматических синтезаторов не позволяет в полной мере использовать их высокую производительность.

В связи с этим мы разработали новый метод твердофазного синтеза олигонуклеотидов, сочетающий достоинства фосфотриэфирного пути с большой скоростью сборки олигонуклеотидной цепи, что являлось главным преимуществом фосфитных подходов. Полимерным носителем в этом методе является макропористый силикагель, к которому известными методами [2, 3] присоединены аминокалькильные цепи. Закрепление на полимере первого нуклеозидного звена осуществляется через его 3'-гидроксильную группу посредством новых якорных групп общего типа  $\text{COCH}_2\text{XCH}_2\text{CO}$ , которые отщепляются легче, чем предложенная нами ранее сукцинатная группа [11], что облегчает снятие продукта с носителя после завершения твердофазного синтеза.

Так, в описываемых ниже опытах использовали  $\text{NH}_2$ -полимер на основе фрактосила 200 фирмы Merck (средний диаметр пор 22 нм, частицы 40–60 мкм), содержащий 130 мкмоль  $\text{NH}_2$ -групп в 1 г. Для присоединения к нему первого нуклеозидного звена 0,2 ммоль N-защищенного 5'-O-диметокситритилнуклеозида в 1 мл дихлорэтана ацилировали 0,4 ммоль 1,4-диоксан-2,6-диона (т. пл. 97°С) в присутствии 4-диметил-аминопиридина и триэтиламина (по 0,2 ммоль каждого, 30 мин при 20°С). Образовавшийся 3'-эфир нуклеозида отмывали от дигликолевой кислоты 0,1 М ТЕАВ, прибавляли 5–6-кратный избыток DCC и триазола и встряхивали с 800 мг  $\text{NH}_2$ -полимера в течение 20 ч, после чего непрореагировавшие аминокислоты ацетиловали 2 М  $\text{Ac}_2\text{O}$  и 2 М MeIm

\* Статья посвящена памяти академика М. М. Шемякина (1908–1970 гг.) в связи с 75-летием со дня его рождения.

Использованы следующие нестандартные сокращения: ClPh – 4-хлорфенил, DCC – диметилдигликоксилкарбодимид,  $(\text{MeO})_2\text{Tr}$  – 4,4'-диметокситритил, MeIm – 1-метилимидазол, TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография. Префикс d (дезоксид) ради краткости всюду опущен, так как в статье упоминаются нуклеозиды и нуклеотиды только дезоксирибы.

Операция	Объем, мл	Время, мин
Детритилирование	1	0,5
Промывка	5	2
Конденсация	0,2	10
Промывка	1	0,5
Кэпирование	0,5	2
Промывка	2	1
		Всего 16

в дихлорэтано (20° С, 10 мин). Содержание  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -нуклеозида в полученном полимере в разных опытах составляло от 40 до 80 мкмоль/г.

Наращивание олигонуклеотидной цепи осуществлялось 5'-О-диметокситритилнуклеозид-3'-хлорфенилфосфатами или их блоками (Р-компоненты). Каждый цикл твердофазного синтеза состоял из трех последовательных стадий: детритилирования, межнуклеотидной конденсации и кэпирования, т. е. блокирования непрореагировавших на предыдущей стадии гидроксильных групп. Все три реакции и промежуточные промывки проводили при 25° С в растворе 1,2-дихлорэтана, так как ранее в нашей лаборатории было установлено [12, 13], что в этом растворителе  $\text{MeIm}$ -катализируемые фосфотриэфирные конденсации протекают с большой скоростью. Использование на протяжении всего синтеза единого растворителя удобно в практическом отношении и позволяет сохранить неизменной сольватацию полимера-носителя, облегчая операции по его отмывке.

Детритилирование проводили при помощи 0,1 М дихлорэтанового раствора трифторуксусной кислоты. Было найдено, что для количественного удаления  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -группы в этих условиях достаточно 30 с и нет необходимости применять более сильные кислоты.

Для межнуклеотидных конденсаций использовали 0,1 М дихлорэтановый раствор Р-компонента, содержащий 0,3 М  $\text{TPS-Cl}$  и 1 М  $\text{MeIm}$ . Полноту реакции контролировали по отщеплению  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -группы (см. выше), определяемой в виде соответствующего катиона при 499 нм. Конденсация практически заканчивалась за 10 мин, и дальнейшая выдержка не приводила к повышению выхода независимо от величины Р-компонента (моно-, ди- или тринуклеотид; с более длинными Р-компонентами реакция нами не исследовалась).

Не вступившие в конденсацию 5'-гидроксильные группы кэпировали обработкой 2 М  $\text{As}_2\text{O}$  и 2 М  $\text{MeIm}$  в дихлорэтано в течение 2 мин. В отличие от работ [1, 7] в нашем методе стадия кэпирования представляется существенной, так как для выделения конечного продукта наращивания олигонуклеотидной цепи решающее значение имеет не его длина (число зарядов), а гидрофобность, зависящая от наличия 5'-концевой  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -группы.

Синтез проводили в масштабе 1–2 мкмоль в термостатированных стеклянных колонках (диаметром от 3 до 5 мм) с впаивным фильтром № 3, хвостовая часть которых оканчивается капилляром. Все операции выполнялись вручную, на проток, без рециркуляции реакционных растворов. Использованные количества реагентов и растворителя, а также продолжительность отдельных операций указаны в таблице. Как следует из строки 3 этой таблицы, в межнуклеотидных конденсациях применялся 10–20-кратный избыток Р-компонента. На один полный цикл операций расходовалось 16 мин, что позволяло провести более 20 циклов за один рабочий день.

Снятие продукта синтеза с полимера и удаление Р- и N-защитных групп проводили при комнатной температуре обычными способами (0,4 М нитробензальдоксимат тетраметилгуанидина в 50% диоксане и конц.  $\text{NH}_3$ ). 5'- $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -олигонуклеотид выделяли хроматографией на  $\text{TR}$ -сефарозе, как описано ранее [14], и гидролизировали 80%  $\text{AsOH}$  при 20° С, анализируя вещество до и после детритилирования при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структуру и гомогенность конечного олигонук-

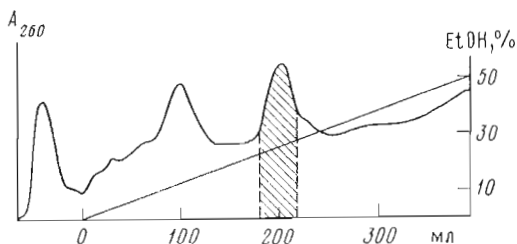


Рис. 1



Рис. 2

Рис. 1. Разделение продуктов аммонолиза N,O,P-защищенного нуклеотида А-С-А-С-А-А-А-А-Т-Т-Т-Т-С-С-Т. Хроматография на TR-сефарозе (колонка 15×20 мм) в 0,05 М ТЕАВ (рН 8,5) с градиентом этанола от 0 до 50%. Выделенная фракция (заштрихована) представляет собой 5'-(MeO)<sub>2</sub>Tr-производное гексадекануклеотида

Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ реакционной смеси после детритилирования фракции, выделенной на TR-сефарозе (рис. 1). Хроматография на колонке Zorbax С-8 в буфере NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,2) с градиентом метанола от 10 до 100% при градиенте буфера от 0,2 М до 0. Скорость элюции 1 мл/мин. Хроматограф Du Pont 8800

леотида проверяли фингерпринтированием или (в случае высших олигомеров) определением нуклеотидной последовательности по Максому — Гилберту.

В модельных экспериментах по оптимизации условий конденсации исследовался синтез гомоолигомеров, чтобы исключить влияние дополнительных факторов, связанных с различной чистотой и реакционной способностью разных препаратов Р-компонентов. Исходя из 1,5 мкмоль [(MeO)<sub>2</sub>Tr]Т, иммобилизованного на 30 мг силикагеля, был синтезирован 23-членный нуклеотид А-А-(Т)<sub>20</sub>-Т. В этом синтезе средний выход 20 конденсаций с мономером [(MeO)<sub>2</sub>Tr]Tr(ClPh) составлял 91% (по выделенному описанным выше способом полностью деблокированному 23-меру средний выход на цикл 78%). Аналогичным образом был осуществлен синтез 51-членного нуклеотида (А-А)<sub>2</sub>-(Т-Т)<sub>23</sub>-Т, причем средний выход 24 конденсаций с димерами [(MeO)<sub>2</sub>Tr]Tr(ClPh)Tr(ClPh) и [(MeO)<sub>2</sub>Tr]bzAr·(ClPh)bzAr(ClPh) превышал 93% (в этом случае для выделения конечного олигонуклеотида применялся способ, который будет описан в отдельном сообщении).

Метод был нами использован для синтеза целевых олигонуклеотидов различной длины и структуры. Например, из 20 мг Т-полимера (содержание Т 45 мкмоль/г полимера) было получено 5,3 ОЕ<sub>260</sub> 16-членного нуклеотида А-С-А-С-А-А-А-А-Т-Т-Т-Т-С-С-Т для конструирования промотора Р25 бактериофага Т5 (суммарный выход выделенного вещества 3,2%, средний выход на цикл 78%). В этом синтезе аммонолиз N,O,P-защищенного гексадекануклеотида проводился непосредственно на полимерном носителе, 5'-(MeO)<sub>2</sub>Tr-производное N,P-деблокированного нуклеотида было выделено как показано на рис. 1 и без дополнительной очистки гидролизовано 80% АсОН. Хроматограмма реакционной смеси после детритилирования приведена на рис. 2, фингерпринт конечного 16-мера — на рис. 3.

Таким образом, нами разработан удобный метод твердофазного синтеза олигонуклеотидов фосфотриэфирным путем на силикагельном носителе в дихлорэтаноле. Метод основан на нуклеофильном катализе фосфотриэфирной межнуклеотидной конденсации с помощью MeIm [12], которая протекает в этом растворителе с большой скоростью [13], благодаря чему

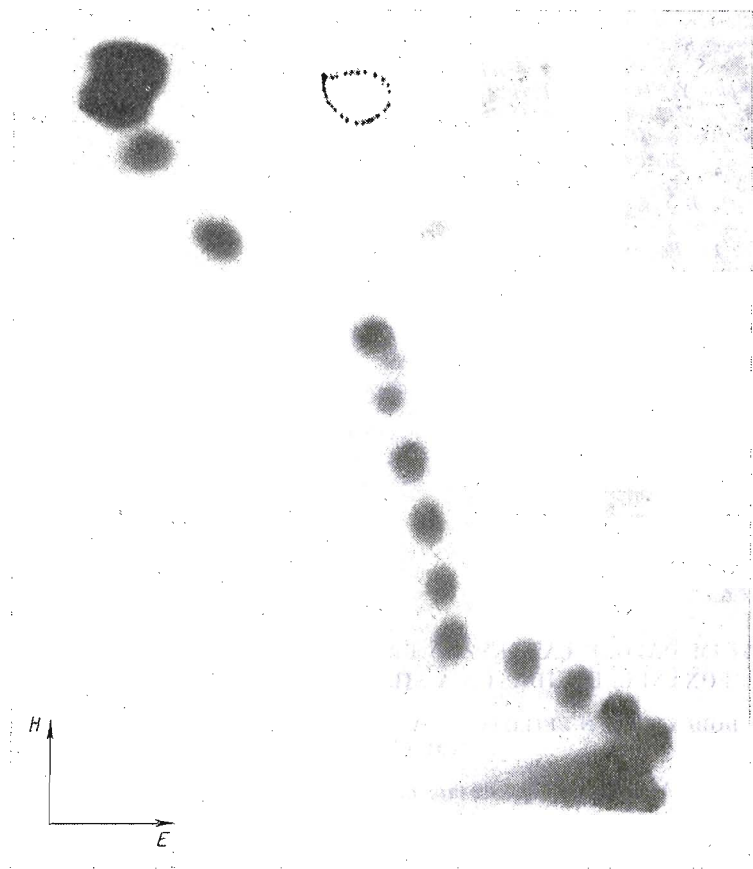


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза  $5'-^{32}\text{P}$ -меченого гексадекануклеотида А-С-А-Г-А-А-А-А-Т-Т-Т-С-С-Т фосфодиэстеразой змеиного яда. Направление Е — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5), Н — гомохроматография в гомосмеси V

на один цикл наращивания олигонуклеотидной цепи затрачивается всего 16 мин. (Для сравнения можно упомянуть, что в наиболее быстром из описанных до настоящего времени твердофазных фосфотриэфирных синтезов, где нуклеотидная конденсация для ускорения процесса проводится при  $60^\circ\text{C}$ , продолжительность одного цикла операций на автоматическом синтезаторе составляет 31 мин [8].) Наконец, разработанный нами метод технически прост, легко осуществим в микромасштабе и позволяет обходиться без высокоэффективной ионообменной хроматографии.

После подготовки настоящей работы к печати появилась публикация [15], в которой описан очень похожий метод твердофазного синтеза олигонуклеотидов на пористом стекле в смесях ацетонитрила с хлористым метиленом. В этой статье выполнен синтез 15-членного нуклеотида путем присоединения к Т-полимеру семи динуклеотидов со средним выходом (определенным по тритильному остатку) 87%; длительность одного цикла 35 мин.

Авторы выражают благодарность А. Н. Вульфсону и С. А. Якимову за проведение анализа с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и Е. Ф. Болдыревой за определение нуклеотидной последовательности синтезированных соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tanaka T., Letsinger R. L. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 10, p. 3249–3260.
2. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185–3191.
3. Chow F., Kempe T., Palm G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2807–2817.

4. Alvarado-Urbina G., Sathe G. M., Liu W.-C., Gillen M. F., Duck P. D., Bender R., Ogilvie K. K. *Science*, 1981, v. 214, p. 270-274.
5. Beaucage S. L., Caruthers M. H. *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, № 20, p. 1859-1862.
6. Ito H., Ike Y., Ikuta S., Itakura K. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 5, p. 1755-1769.
7. Gait M. J., Matthes H. W. D., Singh M., Sproat B. C., Titmas R. C. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 20, p. 6243-6254.
8. 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.
9. Gough G. R., Brunden M. J., Gilham P. T. *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, № 42, p. 4177-4180.
10. Ohtsuka E., Takashima H., Ikehara M. *Tetrahedron Lett.*, 1982, v. 23, № 30, p. 1755-1758.
11. Добрынин В. Н., Чернов Б. Р., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1980, т. 6, № 1, с. 138-140.
12. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1982, т. 8, № 5, с. 660-666.
13. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1983, т. 9, № 3, с. 511-515.
14. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1982, т. 8, № 6, с. 830-839.
15. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 21, p. 6675-6694.

Поступило в редакцию  
22.XII.1982

### METHYLIMIDAZOLE CATALYZED RAPID PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES ON A SILICA GEL SUPPORT IN DICHLOROETHANE

DOBRYNIN V. N., FILIPPOV S. A., BYSTROV N. S., SEVERTSOVA I. V.,  
KOLOSOV M. N.

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

A method for rapid solid-phase synthesis of oligodeoxynucleotides has been developed based on N-methylimidazole catalyzed phosphotriester condensation. The polymer support used was the macroporous silica gel Fractosil 200 aminoalkylated by the published procedures [2, 3] and loaded with 5'-dimethoxytritylated N-protected deoxynucleosides to the trityl content of 40-80  $\mu\text{mol}$  per gram. The nucleosides were anchored on the support by the  $\text{COCH}_2\text{XCH}_2\text{CO}$  type groups, e. g. by treatment with diglycolic anhydride followed by DCC and triazole. Polymer-attached oligonucleotides were assembled of mono-, di-, and trimers of appropriately protected *p*-chlorophenyl 5'-dimethoxytritylnucleoside-3'-phosphates now referred to as P-components. The synthesis was carried out at 25° C in 1,2-dichloroethane as the only solvent. Detritylation was effected by 0.1 M trifluoroacetic acid for 30 seconds. Nucleotide couplings were performed with 0.1 M P-component solutions containing 0.3 M TPS-chloride and 1 M methylimidazole, the condensation being over within 10 minutes. To cap unreacted 5'-terminal hydroxyls, 2 minute acetylation by 2 M  $\text{Ac}_2\text{O}$  and 2 M methylimidazole was used. The total time for the three reactions followed each by washing of the polymer amounted to 16 minutes, which enabled some twenty nucleotide couplings a day to be easily accomplished on a manually operated flow-through system. Oligonucleotides synthesized were cleaved off the support and N,P-deprotected by 0.4 M tetramethylguanidinium nitrobenzaldoxymate in 50% dioxane and concd.  $\text{NH}_3$  aq., isolated in the 5'-DMTr form by chromatography on a TR Sepharose, and detritylated by 80% AcOH. The scope and utility of the method was demonstrated by syntheses of the 23-mer AA(T)<sub>20</sub>T and the 51-mer (AA)<sub>2</sub>(TT)<sub>23</sub>T with the average coupling yields 91% and 93%, respectively, and of the 16-mer ACAGAAAATTTCCT isolated in 3.2% yield.