

Síntesis química de oligonucleótidos por el método de fosfotriéster

V. JIMENEZ, G. PADRON, L. CASTELLANOS, L. RODES

Centro de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba

RESUMEN

En este trabajo se reporta la síntesis química de los desoxioligonucleótidos siguientes: ACTTCTAACCT, GATCACACATT, ACACTTCTTTAT, GACAGACTACCT, CTGCTCTGACAACCT, AAATGTCT, AGCATGCT, TCTGAATGACCTGCATTAAAATAT, GTAAAACGACGGCCAGT y AAACCTCATCTGTGT. Estos fueron obtenidos mediante el método del triéster en solución, empleando distintos tipos de agentes de condensación e introduciendo modificaciones en el procedimiento de aislamiento de los productos de reacción.

Todos los desoxioligonucleótidos sintetizados fueron purificados, una vez desprotegidos, por cromatografía líquida de alta eficacia en columnas de intercambio iónico y fase inversa sucesivamente y comprobada su secuencia por el método de Maxam y Gilbert.

SUMMARY

In this work, we report the chemical synthesis of ten deoxioligonucleotides: ACTTCTAACCT, GATCACACATT, ACACTTCTTTAT, GACAGACTACCT, CTGCTCTGACAACCT, AAATGTGT, AGCATGCT, TCTGAATGACCTGCATTAAAATAT, GTAAAACGACGGCCAGT and AAACCTCATCTGTGT.

The synthesis was performed by the phosphotriester approach in solution and different types of condensation reagents were used. Some modifications were introduced into the isolation procedure of the reaction products.

After deprotection, the deoxyoligonucleotides were purified by ion exchange, and reverse phase high performance liquid chromatography successively and sequenced by the Maxam and Gilbert method.

INTRODUCCION

Los oligonucleótidos sintéticos con secuencias definidas desempeñan un papel decisivo en el esclarecimiento de los mecanismos de numerosos procesos biológicos y son ampliamente empleados en la biología molecular. Su empleo fue esencial para descifrar el código genético (Khorana, 1968) y estudiar los mecanismos de transferencia de la información genética.

La disponibilidad de estos productos ha permitido lograr avances notables en la tecnología del ADN recombinante.

La primera síntesis química de un gen biológicamente activo fue la del gen que codifica el ARN-t de la tirosina (Khorana *et al.*, 1976, 1979) lo que constituyó un acontecimiento notable en la historia de la química.

Posteriormente se han sintetizado varios genes, entre estos están el de la hormona somatostatina (Itakura *et al.*, 1977), el de la insulina (Crea *et al.*, 1978), el del interferón leucocitario humano (Edge *et al.*, 1981, 1983), el del interferón inmune humano (Tanaka *et al.*, 1983).

Independientemente de las múltiples modificaciones que han sido realizadas con la finalidad de optimizar el método del fosfotriéster, continúan teniendo importancia los esfuerzos para establecer métodos más sencillos y eficientes de preparación y purificación de las unidades nucleotídicas, así como para lograr mejor eficiencia en las reacciones de formación del enlace internucleotídico y en los procesos de purificación de los productos de reacción.

En este trabajo se introducen modificaciones en los procedimientos existentes para la síntesis en solución por el método del triéster fosfórico. Esto se ejemplifica a través de la síntesis de diez oligonucleótidos, los cuales han sido empleados como sondas, adaptadores, iniciadores y en mutagénesis dirigida en trabajos de ingeniería genética, con genes de distintos tipos de interferones y otros productos biológicos de interés. Se describen los resultados de la utilización de un agente fosforilante poco común, el fosfocloridato de α -clorofenil- β -cianoetilo que permite lograr rendimientos globales muy elevados en la obtención de mononucleótidos protegidos, simplificando en gran medida los procedimientos comúnmente empleados para fosforilar los desoxinucleósidos N, 5'-O-protegidos. En el trabajo se hace amplio uso de la purificación por cromatografía rápida en columna sobre sílica gel desactivada, empleando el sistema de solvente acétona-agua-acetato de etilo.

RESULTADOS Y DISCUSION

El método del fosfotriéster para la obtención de oligonucleótidos en solución hace uso de los fosfatos de β -cianoetil-O-clorofenil-5'-dimetoxitritil-desoximononucleósidos (IV) como unidades de partida (figura 1). Los procedimientos de N-acilación y de protección del grupo hidroxilo en la posición 5' en los desoxinucleósidos han experimentado escasas modificaciones con respecto a los trabajos pioneros de Khorana (Schaller *et al.*, 1963). Sin embargo, la fosforilación de estos compuestos (III) fundamentada en el método de Narang (Itakura *et al.*, 1973, Stawinski *et al.*, 1976) ha sido objeto de varias modificaciones (Broka *et al.*, 1980; Efimov *et al.*, 1982a).

Todas estas variantes presentan el inconveniente de ser laboriosas y los rendimientos no son siempre reproducibles. Un procedimiento más sencillo fue descrito en 1981 por Tamm (De Bernardini *et al.*, 1981). Este método ha sido utilizado intensamente por nosotros y permite la obtención de (IV) en una sola etapa, empleando para ello como agente fosforilante el

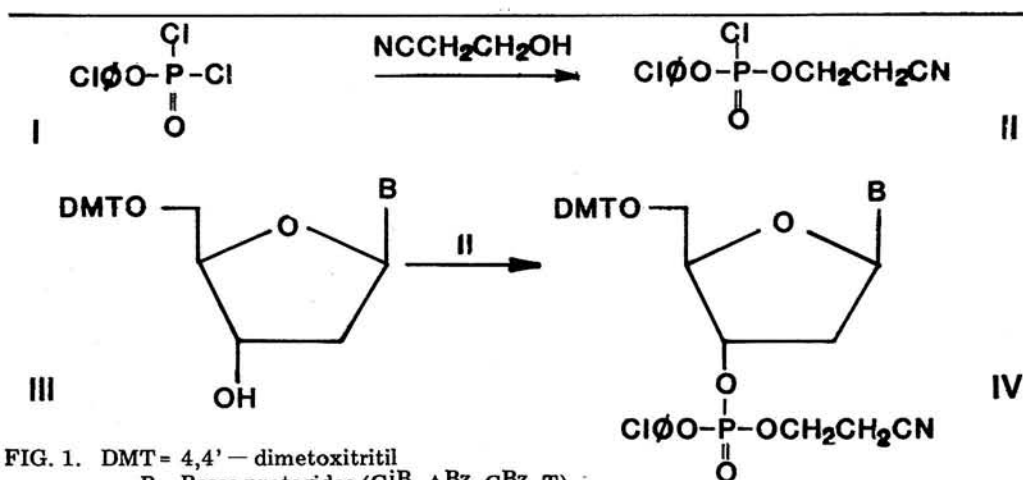
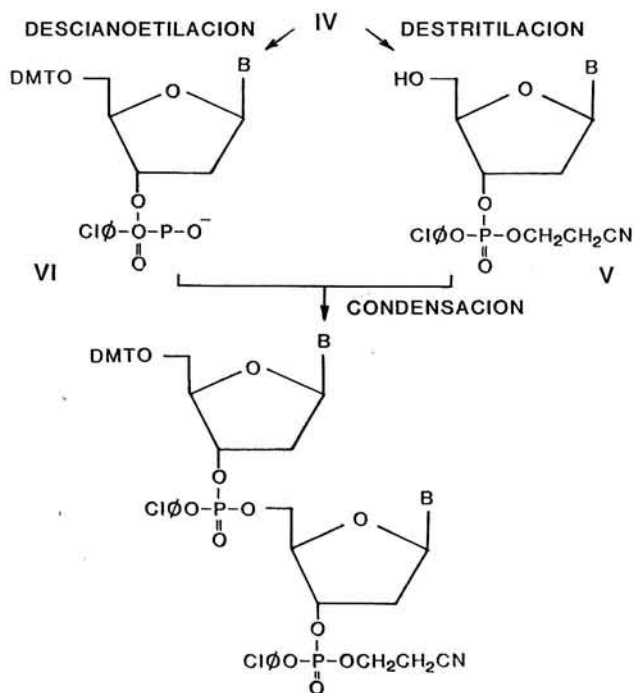


FIG. 1. DMT= 4,4' - dimetoxitritil
 B= Bases protegidas (GⁱB, ABz, CBz, T)
 Clφ = o-clorofenil

fosfocloridato de o-clorofenil-β-cianoetilo (II), el cual a su vez se obtiene cianoetilando fosfodiclорidato de o-clorofenilo (I). Este agente de fosforilación es estable, pudiendo conservarse a -70°C por tiempo indefinido y se logran rendimientos reproducibles que fluctúan entre 85% y 95% en los desoximonucleótidos totalmente protegidos. Su purificación se realiza por cromatografía rápida de columna sobre sílica gel.

Los oligonucleótidos sintetizados en fase líquida que aparecen en este trabajo, fueron obtenidos de acuerdo con el esquema general de reacción (figura 2).



REACCIONES DE DESPROTECCION

Destritilación

La hidrólisis del grupo dimetoxitritilo para liberar el hidroxilo en 5' se realiza en medio ácido. Se utilizó en nuestro trabajo el ácido benceno sulfónico (ABS), ácido p-toluenosulfónico, ambos al 2% en cloroformo: metanol (7:3 v/v) y ácido trifluoroacético (ATF) al 2% en diclorometano.

En todos los casos se ha verificado la existencia de productos colaterales, probablemente a causa de reacciones de despurinación. Se seleccionó el ATF al 2% en diclorometano, pues permite lograr una destritilación efectiva a 0°C en sólo diez minutos con un mínimo de despurinación.

Los mononucleótidos destritilados (V), se purifican por cromatografía rápida de columna, pero en el caso de bloques mayores, la reacción de condensación se realiza usualmente sin aislar el compuesto destritilado.

Descianoetilación

La eliminación del grupo cianoetilo para liberar el grupo fosfato se efectúa mediante tratamiento con aminas.

Los procedimientos más generalizados emplean trietilamina (TEA) en piridina al 10% y TEA:agua:piridina (1:1:3).

Ambas variantes permiten lograr una descianoetilación prácticamente cuantitativa, pero las dos presentan inconvenientes. La primera es muy lenta, necesiéndose 1,5 horas para completar la reacción, mientras que la segunda, aunque más rápida (40 minutos de reacción) al introducir agua en el sistema obliga a un proceso de secado posterior más exhaustivo.

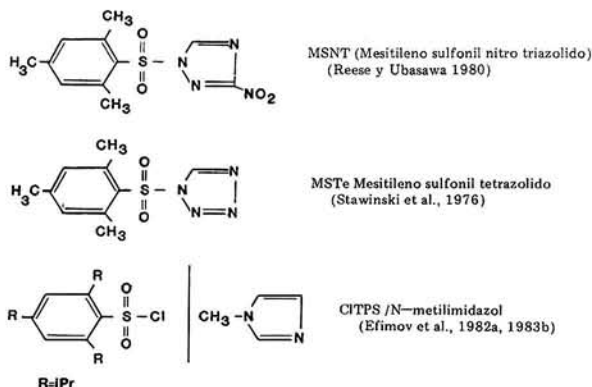
Por estas razones se adoptó el método de Hsiung, que emplea aminas primarias impedidas estéricamente (Hsiung *et al.*, 1983). Con *ter*-butilamina al 10% en piridina la reacción concluye en diez minutos, manteniéndose las condiciones anhidras.

Agentes condensantes

En la búsqueda de una alta eficiencia en la formación del enlace internucleotídico, se han propuesto numerosos agentes condensantes.

Actualmente se ha logrado disminuir considerablemente el tiempo requerido en la síntesis de oligonucleótidos. No obstante, en algunos de estos agentes, el incremento de la efectividad de activación del enlace fosfato va acompañada con la formación de productos indeseables, generalmente de sulfonación en el hidroxilo 5' o en el anillo de las bases.

En este trabajo se ha empleado indistintamente tres agentes de condensación: MSTe, MSNT y CITPS/MeIm (figura 3).



Con estos tres agentes se obtienen rendimientos que no difieren entre sí significativamente (tablas 1 y 2). Sin embargo, cuando se emplea MSNT o MSTe en la preparación de unidades nucleotídicas de pequeño tamaño, se ha observado la aparición de productos de sulfonación

Tabla 1
RENDIMIENTOS Y AGENTES DE CONDENSACION
EMPLEADOS EN LA SINTESIS DE DIMEROS

<i>Dímero</i>	<i>Agente Condensación</i>	<i>Tiempo de Reacción</i>	<i>Rendimiento %</i>
AA	CITPS/MeIm	30 min.	83
	MSTe	2 horas	80
	MSNT	30 min.	68
AC	CITPS/MeIm	30 min.	78
	MSTe	2 horas	80
AG	CITPS/MeIm	30 min.	76
	MSNT	30 min.	72
AT	CITPS/MeIm	30 min.	68
	MSTe	2 horas	74
CA	CITPS/MeIm	30 min.	83
	MSTe	2 horas	88
CC	CITPS/MeIm	30 min.	88
	MSTe	2 horas	90
CG	CITPS/MeIm	30 min.	78
	MSTe	2 horas	75
CT	CITPS/MeIm	30 min.	88
	MSTe	2 horas	87
	MSNT	30 min.	75
GA	CITPS/MeIm	30 min.	80
	MSTe	2 horas	82
	MSNT	30 min.	79
GC	CITPS/MeIm	30 min.	82
	MSNT	30 min.	80
GG	CITPS/MeIm	30 min.	86
	MSNT	30 min.	66
GT	CITPS/MeIm	30 min.	78
	MSNT	30 min.	74
TA	CITPS/MeIm	30 min.	74
	MSTe	2 horas	77
TC	CITPS/MeIm	30 min.	86
	MSNT	30 min.	87
TG	CITPS/MeIm	30 min.	82
	MSNT	30 min.	63
TT	CITPS/MeIm	30 min.	88
	MSTe	2 horas	76
	MSNT	30 min.	80

Tabla 2

OLIGONUCLEOTIDOS SINTETIZADOS POR EL METODO DEL FOSFOTRIESTER EN SOLUCION

Oligonucleótidos sintetizados por el método del fosfotriéster en solución	Reactivo de condensación	Bloques empleados en la última etapa de condensación	Tiempo de reacción de la última etapa de condensación	Rendimiento de la última etapa de condensación *
ACTTCTTAACCT	CITPS/MeIm	4 + 8	1 hora	68
GATCACACATTT	MSNT	3 + 9	2 horas	48
ACACTTCTTTAT	MSTe	3 + 9	10 horas	61
GACAGACTACCT	MSTe	3 + 9	11 horas	47
CTGCTCTGACAACT	MSNT	8 + 7	2 horas	60
AAATGTGT	MSTe	3 + 5	6 horas	64
AGCATGCT	CITPS/MeIm	3 + 5	50 min.	66
TCTGAATGACCTGCATTAAAATAT	MSNT	8 + 16	2 horas	51
GTA AAAACGACGGCCAGT	CITPS/MeIm	7 + 8	2 horas	46
AAACCTCATCTGTGT	CITPS/MeIm	7 + 8	1 hora	60

* Calculado respecto a la cantidad de componente hidroxílico

que prácticamente siempre acompañan al producto de la condensación. Ello complica la purificación, pues en los sistemas de columna, utilizando gel de sílice, los tiempos de retención de los productos sulfonados son muy similares a los del producto de condensación. La detección por cromatografía en capa delgada es difícil, y a veces estos derivados se hacen evidentes sólo cuando se analizan los productos de descianoetilación, apareciendo nítidamente como una mancha oscura en el punto de aplicación.

En el caso del MSTe se requieren tiempos prologados de reacción para efectuar la condensación entre fragmentos de mayor tamaño.

En la preparación de bloques nucleotídicos menores (dímeros, trímeros, tetrámeros y otros), con el CITPS/MeIm se obtienen buenos resultados en tiempos muy cortos de reacción y no se hacen evidentes los productos de sulfonación. En las condensaciones entre fragmentos de mayor peso molecular con el CITPS/MeIm, el consumo del componente hidroxílico (sustancia limitante) es completo a los 45–60 minutos de reacción. En estos casos con el MSNT se requieren dos horas de reacción.

De acuerdo con los datos obtenidos, para la preparación de dímeros y unidades menores es conveniente el empleo de CITPS/MeIm y en las condensaciones entre fragmentos de mayor peso molecular el MSNT y el CITPS/MeIm ofrecen resultados similares.

Desprotección total de los oligonucleótidos

Primeramente el oligonucleótido totalmente protegido se destritila y se purifica en columna corta sobre sílica gel. Posteriormente se efectúa la amonólisis directamente con amoniaco al 33% y piridina a 50°C durante 5–6 horas. Los resultados obtenidos han sido satisfactorios.

Los oligonucleótidos, una vez desprotegidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en columnas de intercambio iónico y fase inversa sucesivamente.

Cromatografía preparativa a presión moderada

Con vistas a reducir los tiempos invertidos en la purificación de intermediarios, se ha utilizado la cromatografía preparativa en columnas sobre gel de sílice bajo presiones de 1,5–2 atm, lográndose flujos de 20–30 ml/min. Se ha adoptado el sistema de solventes reportado por Narang (Hsiung *et al.*, 1980) acetato de etilo/acetona/agua.

Se utilizó sílica gel con un margen estrecho del diámetro de las partículas: sílica gel 60, 0,015–0,040 mm, lo que mejoró notablemente la resolución y unido a los flujos elevados, permitió reducir el tiempo de purificación a 2–2,5 horas incluso en el caso de bloques de mayor tamaño.

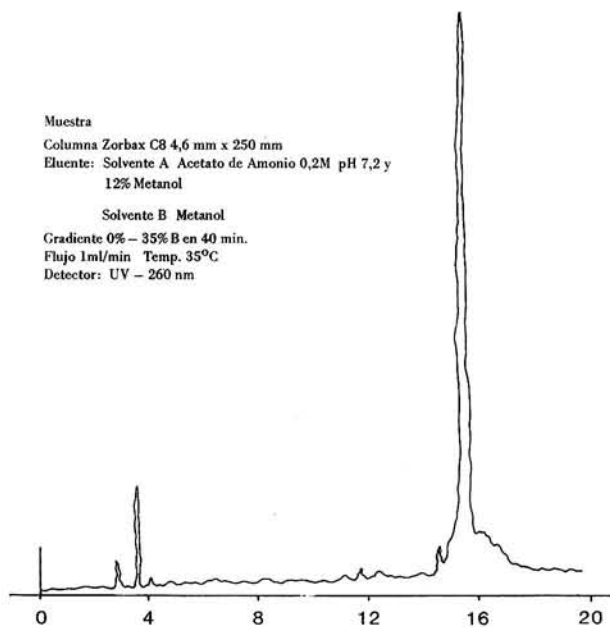
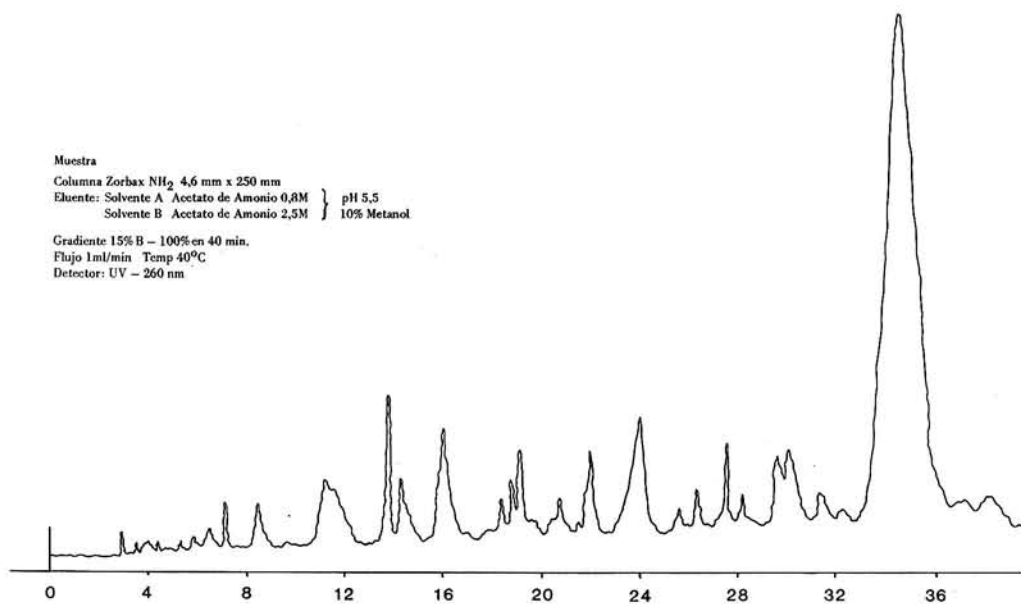
Este método se empleó, variando las proporciones de acetona en la purificación de todos los dímeros, trímeros y tetrámeros sintetizados, incluyendo la purificación en gran escala de los dímeros. También fue extendido a la purificación en gran escala de los cuatro monómeros destritolados y de los monómeros totalmente protegidos con excepción de la timidina.

Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

Los desoxioligonucleótidos sintetizados, totalmente desprotegidos, se purifican por CLAE. La estrategia seguida es la purificación sucesiva por columnas de intercambio iónico y de fase inversa (Wulfson y Yakimov, 1983). En la purificación por intercambio iónico se emplea un gradiente lineal de acetato de amonio de 0,8 M a 2,5 M (pH 5,5) con 10% de metanol en 40 minutos, mientras que en la purificación por fase inversa se emplea un gradiente lineal de metanol en agua del 12% al 45% en 40 minutos.

Los oligonucleótidos sintetizados fueron purificados de esta forma obteniéndose una pureza superior al 98% en todos los casos.

En las figuras 4 y 5 se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de un eicosatetra nucleótido.



Síntesis en fase sólida

La obtención de desoxioligonucleótidos en fase sólida se efectuó empleando como soporte la resina de poliestireno clorometilada con 1% de divinil-benceno (Biorad) y siguiendo el procedimiento descrito por Itakura (Ito *et al.*, 1982). Como agente de condensación se utilizó CITPS y N-metilimidazol (Efimov *et al.*, 1983). Se han obtenido rendimientos de 85%–95% en cada etapa de adición, con tiempos de reacción de 20–30 minutos, en dependencia del bloque que se adiciona.

Por este procedimiento se han obtenido varios oligonucleótidos y los detalles experimentales serán objeto de otra publicación.

MATERIALES Y METODOS

Los reactivos utilizados en el trabajo sintético son de grado analítico.

La piridina se destiló sobre óxido de bario, el dioxano y el tetrahidrofurano se destilaron sobre sodio y se conservaron sobre tamiz molecular de 4Å.

Los desoxinucleósidos dA, dC, dG y T se adquirieron en las casas Sigma, Boehringer, PL--Biochemicals y Yoshitomi. Otros reactivos utilizados son los siguientes: cloruro de dimetoxitritilo (CIDMT), cloruro de 2-mesitilensulfonilo, cloruro de 2,4,6-triisopropilbencenosulfonilo (Aldrich y Fluka), 3-hidroxipropionitrilo (Merck y Aldrich), acrilamida y bis-acrilamida (Biorad), N-metilimidazol (Fluka y Merck), o-clorofenol, oxiclорuro de fósforo, trietilamina, ter-butilamina y acetato de amonio (Merck).

La cromatografía de capa delgada (CCD) se realizó sobre gel de sílice en placas de aluminio con indicador fluorescente F₂₅₄ (Merck) utilizando como disolvente CHCl₃:MeOH (9:1,v:v). La detección del grupo dimetoxitritilo se efectuó por aspersion de la placa con ácido perclórico 50%--vainillina 1% y calentamiento de 150°C.

Las purificaciones mediante cromatografía en columna se realizaron bajo presión utilizando como adsorbente silica gel 60; 0,015–0,040 mm (Merck).

La cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) se realizó en un equipo Hitachi, modelo 638-30 en columnas de intercambio iónico, Zorbax-NH₂ y de fase inversa, Zorbax C-8 (Du Pont).

Procedimientos generales

Síntesis de nucleósidos protegidos

Los desoxinucleósidos 5'-dimetoxitritil-N-acilados (III) se obtuvieron mediante los métodos descritos en la literatura (Schaller *et al.*, 1982).

Reacción de fosforilación de nucleósidos protegidos

La fosforilación de los desoxinucleósidos 5'-dimetoxitritil-N-acilados (III) se realizó con el fosfocloridato de o-clorofenil, β-cianoetilo en presencia de N-metilimidazol.

a) Síntesis del fosfodiclорidato de o-clorofenilo (I)

(Owen y Reese, 1974) 0,50 moles (64,28 g, 51 ml) de o-clorofenol, 2,73 moles (250 ml) de oxiclорuro de fósforo, y 100 mg de AlCl₃ se calientan a reflujo durante 3 horas. Se destila a vacío con trompa de agua el exceso de oxiclорuro de fósforo. El residuo se destila a presión reducida, colectándose el fosfodiclорidato de o-clorofenilo (T. eb. 92–95°C, 4 mm Hg) rendimiento: 85%.

b) *Síntesis de fosfocloridato de o-clorofenil β -cianoetilo (II)*

100 mmoles (24,5 g) de fosfodicloridato de o-clorofenilo ($d = 1,57$) y 110 mmoles (7,48 ml) de β -cianoetanol se disuelven en 80 ml de dioxano. A esta solución se adicionan con agitación en el transcurso de 30 minutos 110 mmoles de trietilamina recién destilada sobre óxido de bario. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtra rápidamente en atmósfera de nitrógeno seco, se lava el residuo de clorhidrato de trietilamina con dioxano o tetrahidrofurano y la solución se destila a presión reducida hasta aceite, el que se utiliza sin purificación posterior.

c) *Síntesis de fosfatos de β -cianoetil-o-clorofenil-5'-dimetoxitritil-desoximononucleósidos (IV)*

10 mmoles de nucleósido 5'-Dimetoxitritil-N-acilado se coevaporan a presión reducida dos veces con 50 ml de piridina anhidra. El residuo (en atmósfera de nitrógeno seco) se disuelve en 60 ml de tetrahidrofurano y se adicionan 25 mmoles (5,7 ml) de fosfocloridato de o-clorofenil β -cianoetilo (en el caso de DMTG^{ib}, se utiliza un exceso de 2,5 veces). A continuación se añaden 30 mmoles (2,4 ml de N-metilimidazol (2 veces para DMTG^{ib}). La reacción se chequea a los 30 minutos mediante CCD. Si la reacción está concluida se añaden 40 ml de agua/piridina 1:1 y se mantiene en reposo durante 15 minutos (60 minutos para DMTG^{ib}). Después de evaporar el tetrahidrofurano se disuelve el residuo en diclorometano, se lava dos veces con solución acuosa de NaHCO_3 al 5%, se concentra a presión reducida y se purifica en cromatografía de columna rápida sobre sílica gel utilizando como solvente acetato de etilo/acetona/agua 95,5/3/1,5. Este sistema se aplicó en la purificación de DMTdG^{ib}_{Pce}*, DMTdA^{bz}_{Pce} y DMT C^{bz}_{Pce}. La purificación del DMTdTP_{Pce} se realizó utilizando como solvente mezclas de polaridad creciente de $\text{Cl}_2\text{CH}_2/\text{MeOH}$.

Método general para la síntesis de bloques

a) *Reacción de destritolación*

A 1 mmol del compuesto totalmente protegido se adicionan 20 ml de ácido trifluoroacético en CH_2Cl_2 al 2% a 0°C. El curso de la destritolación se sigue por CCD, la que concluye en 10 minutos. Se extrae con NaHCO_3 acuoso 5%, agua y se concentra. Se purifica por cromatografía en columna.

b) *Reacción de descianoetilación*

A 1 mmol del compuesto totalmente protegido se adicionan 6 ml de una solución al 10% de ter-butilamina en piridina. La descianoetilación se sigue por CCD. Generalmente es total al cabo de 10 minutos. Se destila a presión reducida hasta formación de "espuma".

c) *Reacción de condensación*

1 mmol del compuesto 5'-hidroxilado y 1,2 mmoles del componente nucleotídico se secan por coevaporación con piridina anhidra dos veces. El residuo se disuelve en 10 ml de piridina anhidra y se adicionan 2,5 mmoles de CITPS y 7 mmoles de N-metilimidazol. El curso de la reacción se sigue por CCD, la cual se completa entre 30-60 minutos en dependencia del tamaño de los bloques.

Se adicionan 3 ml de agua, se destila a presión reducida y el residuo se disuelve en CH_2Cl_2 . Se extrae dos veces con solución de NaHCO_3 al 5%, la fase orgánica se lava con agua y

* Nomenclatura utilizada para designar nucleósidos totalmente protegidos (IV)

se destila a sequedad. El residuo se coevapora con tolueno para eliminar la piridina y se purifica en cromatografía de columna rápida. Los dímeros se eluyen con acetato de etilo/acetona/agua; 92,5/6/3,5. Los trímeros y tetrámeros con acetato de etilo/acetona/agua; 89,5/9/1,5 y finalmente con acetato de etilo/acetona/agua; 78,5/20/1,5. Para unidades mayores que los tetrámeros se empleó como eluyente mezclas de polaridad creciente de $\text{Cl}_2\text{CH}_2/\text{MeOH}$.

Desprotección y purificación

Después de efectuar todas las reacciones de acoplamiento el DMT-oligonucleótido protegido se destitila en presencia de ATF en CH_2Cl_2 al 2%. El oligonucleótido se purifica en columna corta sobre sílica gel utilizando gradiente lineal de MeOH en CH_2Cl_2 (0-15%). Se colectan las fracciones adecuadas, se concentran a presión reducida y se trata el residuo con 4,5 ml de NH_3 al 33% y 0,5 ml de piridina a 50°C por 5-6 horas. Después de evaporar a presión reducida el residuo se disuelve en 5 ml de disolución de bicarbonato de trietilamonio (BTEA) 0,1 M y se extrae tres veces con acetato de etilo. La solución acuosa se evapora a sequedad, el residuo se disuelve en agua y el oligonucleótido se purifica mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). La purificación se efectúa utilizando sucesivamente columnas de intercambio iónico y fase inversa.

Marcaje con ^{32}P y secuencia

Los oligonucleótidos purificados se marcaron utilizando [γ - ^{32}P] ATP y kinasa de T4 polinucleotídica y la secuencia se realizó utilizando en lo fundamental el método de Maxam y Gilbert (1980).

REFERENCIAS

- BROKA, C.; T. HOZUMI; R. ARENTZEN y K. ITAKURA (1980). *Simplifications in the synthesis of short oligonucleotide blocks*. Nucleic Acids Res. **8**, 5461-5471.
- CREA, R.; A. KRASZEWSKI; T. HIROSE y K. ITAKURA (1978). *Chemical synthesis of genes for human insulin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5765-5769.
- DE BERNARDINI, S.; F. WALDMEIER y C. TAMN (1981). *Nucleosides and Nucleotides. Part 17. A simple preparation of protected deoxynucleoside-3'-phosphates*. Helv. Chim. Acta **64**, 2142-2147.
- EDGE, M. D.; A. GREENE; G. HEATHCLIFFE; P. MEACOCK; W. SCHUCH; D. SCANLON; T. ATKINSON; C. NEWTON y A. MARKHAM (1981). *Total synthesis of a human leukocyte interferon gene*. Nature **292**, 756-762.
- EDGE, M. D.; A. R. GEEN; G. R. HEATHCLIFFE; V. E. MOORE; N. J. FAULKNER; R. CAMBLE; N. N. PETTER; P. TRUEMAN; W. SCHUCH; J. HENNAM; T. C. ATKINSON; C. R. NEWTON y A. F. MARKHAM (1983). *Chemical Synthesis of a human interferon- α 2 gene and its expression in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **11**, 6419-6435.
- EFIMOV, V.; S. REVERDATTO y O. CHAKHMAKHCHEVA (1982a). *New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates*. Nucleic Acids Res. **10**, 6675-6694.
- EFIMOV, V.; S. REVERDATTO y O. CHAKHMAKHCHEVA (1982b). *Arylsulfonyl chlorides in the presence of N-Methylimidazole as efficient condensing reagents in phosphotriester oligonucleotide synthesis*. Tetrahedron Letters **23**, 961-964.

- EFIMOV, V.; A. BURYAKOVA; S. REVERDATTO; O. CHAKHMAKHCHEVA y Y. OVCHINNIKOV (1983). *Rapid synthesis of long-chain deoxyribooligonucleotides by the N-methylimidazolidine phosphotriester method*. Nucleic Acids Res. **11**, 8369-8387.
- GAIT, M. J.; H. W. D. MATTHES; M. SINGH; B. S. SPROAT y R. C. TITMAS (1982). *Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments*. H. G. Gassen y A. Lang Editores, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel 1-42.
- HSIUNG, H.; W. SUNG; R. BROUSSEAU y S. A. NARANG (1980). *Synthesis of the human insulin gene. Part III Chemical synthesis of 5'-phosphomonoester group containing deoxyribooligonucleotides by the modified phosphotriester method. Its application in the synthesis of seventeen fragments constituting human insulin C-Chain DNA*. Nucleic Acids. Res. **8**, 5753-5765.
- HSIUNG, H.; S. INOUE; J. WEST; B. STURM y M. INOUE (1983). *Further improvements on the phosphotriester synthesis of deoxyribonucleotides and the oligonucleotide directed sitespecific mutagenesis of E. coli lipoprotein gene*. Nucleic Acids Res. **11**, 3227-3239.
- ITAKURA, K.; C. BAHL; N. KATAGIRI; J. MICHNIEWICZ; R. WIGHTMAN y S. A. NARANG (1983). *A Modified Triester Method for the synthesis of Deoxyribooligonucleotides*. Can. J. Chem. **51**, 3649-3651.
- ITAKURA, K.; T. HIROSE; R. CREA; A. D. RIGGS; H. L. HEYNEKER; F. BOLIVAR y H. W. BOYER (1977). *Expression in Escherichia coli of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatine*. Science, **198**, 1056-1063.
- ITO, H.; S. IKE; IKUTA y ITAKURA (1982). *Solid phase synthesis of polynucleotides. VI Further studies on polystyrene copolymers for the solid support*. Nucleic Acids Res. **10**, 1755-1769.
- KHORANA, H. G. (1968). *Nucleic Acids Synthesis*. Pure Appl. Chem. **17**, 349-381.
- KHORANA, H. G.; K. L. AGARWAL; P. BESMER; H. BÜCHI; M. H. CARUTHERS; P. J. CASHION; M. FRIDKIN; E. JAY; K. KLEPPE; R. KLEPPE; A. PANET; U. L. RAY BHANDARY; B. RAMAMOORTHY; T. SEBIYA; T. TABEYA y J. H. VAN DE SANDE (1976). *Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **251**, 265-570.
- KHORANA, H. G. (1979). *Total synthesis of a Gene*. Science **203**, 614-625.
- MAXAM, A. M. y W. GILBERT (1980). *Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages*. Methods in Enzymology **65**, 499-560.
- NARANG, S. A.; R. BROUSSEAU; H. M. HSIUNG y J. J. MICHNIEWICZ (1980). *Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method*. Methods in Enzymology **65**, 610-620.
- OWEN, G. R. y C. B. REESE (1974). *Preparation of aryl and 2, 2, 2-trihaloethyl dihydrogen phosphates*. Synthesis, 704-705.
- REESE, C. y A. UBASAWA (1980). *Reaction between 1-arenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazoles and nucleoside base residues. Elucidation of the nature of side-reactions during oligonucleotide synthesis*. Tetrahedron Letters **21**, 2265-2268.
- SCHALLER, H.; G. WEIMANN; B. LERCH y H. G. KHORANA (1963). *Studies on Polynucleotides XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribooligonucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new synthesis of deoxyribonucleoside 3' phosphates*. J. Am. Chem. Soc. **85**, 3821-3827.
- STAWINSKI, J.; T. HOZUMI y S. A. NARANG (1976). *Arylsulfonyltetrazoles as highly efficient condensing reagents for polynucleotide synthesis*. Can. J. Chem. **54**, 670-672.

- TANAKA, S.; T. OSHIMA; K. OHSUYE; T. ONO; A. MIZONO, A. UENO; H. NAKAZATO; M. TSUJIMOTO; N. HIGASHI y T. NOGUCHI (1983). *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized gene for the human immune interferon*. Nucleic Acids Res. **11**, 1707-1723.
- WULFSON, A. y S. YAKIMOV (1983). *High Performance Liquid Chromatography of Nucleotides: general methods and their development*. Biorg. Chem. (USSR) **9**, 365-390.