



УДК 577.113.6:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВI. ИССЛЕДОВАНИЕ НОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ МАРКИ  
«СИЛОХРОМ»*Ломakin А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.**Всесоюзный научно-исследовательский институт  
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Для автоматического твердофазного фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов получены носители на основе отечественного силикагеля марки «Силохром», на одном из которых осуществлен синтез декадезоксирибонуклеотида АСТГТССГСТ на установке «Виктория-2» в автоматическом режиме. Предложен простой и эффективный способ удлинения спейсерной группы с помощью 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината, который может проводиться в автоматическом режиме и приводит к значительному улучшению свойств носителей.

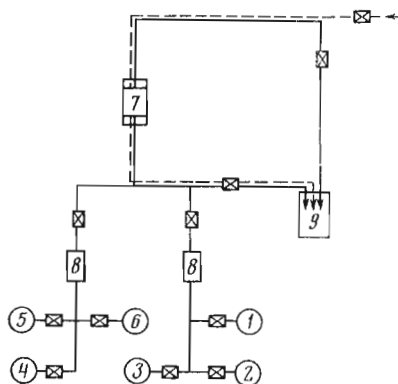
Одной из ключевых проблем твердофазного метода синтеза олигонуклеотидов является выбор полимерного носителя. В последние годы значительные успехи были достигнуты при использовании полиамидных [1] и полистирольных гелей [2], носителей на основе силикагеля [3-5], пористого стекла [6], целлюлозы [7], а также привитых полистирол-тефлоновых носителей [8]. Механически стабильные, легко отмывающиеся, ненабухающие неорганические носители на основе силикагеля представляются наиболее подходящими для автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Однако почти все носители этого типа получают на основе дорогостоящих силикагелей для ВЭЖХ марки «Porasil» [3, 4], «Fractosil» [5] и др. В литературе отсутствуют данные по использованию для этой цели отечественных силикагелей. В настоящей работе мы получили ряд носителей на основе силикагеля марки «Силохром» (С-40 МК, С-80, С-120) и сравнили их с носителем на основе пористого стекла с контролируемым размером пор (СРГ), который успешно использовался в синтезе олигонуклеотидов фосфотриэфирным [6] и фосфитным методами [9].

Физические параметры выбранных образцов силикагеля и пористого стекла приведены в табл. 1. Модификацию носителей осуществляли по известной методике, разработанной для фосфитного синтеза [10], последовательной обработкой аминопропилтриэтоксисиланом, триметилхлорсиланом и янтарным ангидридом в присутствии 4-*N,N*-диметиламинопиридина. К полученным таким образом носителям, содержащим якорные карбоксильные группы, присоединяли 5'-О-диметокситритилтимидин с помощью *N,N'*-дициклогексилкарбодимида. Количество введенного нуклеозида составило 38, 42 и 59 мкмоль на 1 г носителя для С-40 МК, С-80 и С-120 соответственно. Аналогичным способом из пористого стекла, содержащего якорные аминопропильные группы, был получен носитель, 1 г которого содержал 29 мкмоль нуклеозида.

Для сравнения свойств полученных носителей в качестве модели мы выбрали синтез тетратимидинтрифосфата (Tr)<sub>3</sub>T, который имеет длину, достаточную для выделения методом ионообменной ВЭЖХ, и при получении которого можно легко контролировать протекание первых стадий кон-

Принятые сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил, MS — мезитилсульфонилхлорид, TPS — триизопропилабензолсульфонилхлорид, MeIm — *N*-метилимидазол. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC — IUB. Префикс «d» (дезоксид) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

Рис. 1. Гидравлическая схема установки «Виктория-2»: 1 — емкость для 3%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в 1,2-дихлорэтане, 2 — для хлороформа, 3 — для пиридина, 4 — для абс. пиридина, 5 — для раствора защищенного мононуклеотида (или нуклеозид 3'-О-сукцината), 6 — для копирующего раствора, 7 — реактор с полимерным носителем, 8 — дозирующие емкости, 9 — емкость для слива. Сплошными линиями показано направление движения жидкостей, пунктиром — направление движения осушенного воздуха



денсации. Навеску носителя, содержащую 3–7 мкмоль нуклеозида, помещали в стеклянный реактор установки для автоматического синтеза олигонуклеотидов «Виктория-2», изготовленной в СКТБ СЭиАП СО АН СССР и отличающейся от описанной ранее [11] возможностью параллельного синтеза в двух реакторах и иной гидравлической схемой (рис. 1). Некоторые изменения, внесенные нами в гидравлическую схему, позволили при переходе к каждой следующей операции освобождать носитель, находящийся в реакторе, от предыдущего растворителя (или раствора) с помощью осушенного воздуха под давлением 0,5 атм, подведенного к реактору через систему пневмоклапанов. Деблокирование раствором 3%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в 1,2-дихлорэтане [5] и все промывки носителя осуществляли в автоматическом режиме с помощью блока электронного управления, позволяющего программировать непрерывное выполнение 14 циклов, каждый из которых может содержать до 15 операций. Карта операций для одного цикла приведена в табл. 2. Скорость промывок 100 мл/ч.

Для наращивания цепи использовали 0,1–0,15 М раствор 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-*n*-хлорфенилфосфата в абс. пиридине, активированно-смесь мезитилсульфонилхлорида и метилимидазола, который вводили в реактор с помощью шприца. Отщепление  $(\text{Tr})_3\text{T}$  от носителя и полное деблокирование осуществляли последовательной обработкой смесью конц. аммиак — пиридин (9:1, 72 ч при 20°С) и 80% уксусной кислотой (30 мин при 20°С). Реакционные смеси анализировали методом ионообменной ВЭЖХ на колонке с Partisil 10 SAX в градиенте калий-фосфатного буфера (рис. 2). Выходы на стадиях определяли как по количеству диметокситритилкарбинола, содержащегося в объединенных элюатах операций № 3 и 4 (табл. 2), так и по количеству выделенного после ионообменной ВЭЖХ продукта  $(\text{Tr})_3\text{T}$ . Результаты экспериментов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Физические параметры носителей и выходы на стадиях при получении на них  $(\text{Tr})_3\text{T}$

Носитель *	Размер частиц, мм	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Средний диаметр пор, нм	Емкость, мкмоль [(MeO) <sub>2</sub> Tr]T/г	Выход (по (MeO) <sub>2</sub> TrOH), %		Выход (Tr) <sub>3</sub> T после ВЭЖХ, %	Средний выход на стадию после ВЭЖХ, %
					1-я стадия	2-я стадия		
СРГ	0,2–0,8	70	55	29	89	36	57	83
С-80	0,2–0,3	70–100	40–60	42	88	92	66	87
С-120	0,1–0,2	100–140	20–30	59	89	98	57	83
С-40 МК	0,1–0,2	50–90	~50	38	26	75	12	50
					96 **	91 **	37,3 **	72 **

\* Носители перед иммобилизацией [(MeO)<sub>2</sub>Tr]T модифицированы как описано в «Экспериментальной части».

\*\* Данные для носителя на основе С-40 МК с удлиненной спейсерной группой (С\*-40 МК).

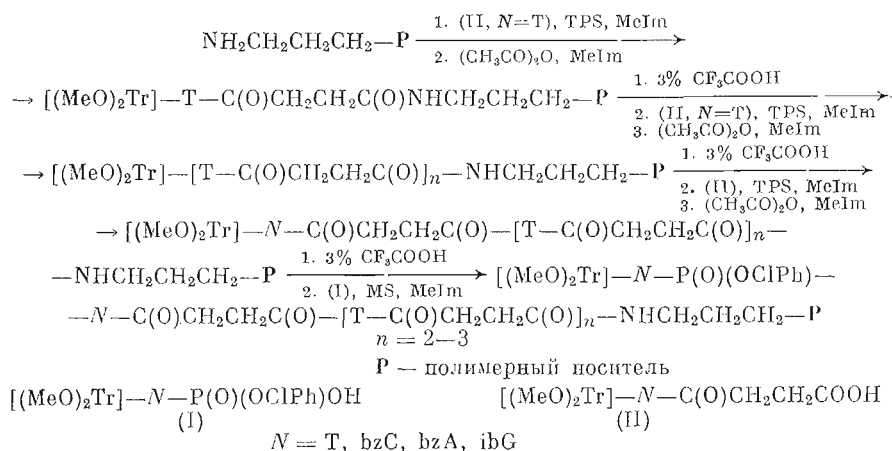
Карта операций для одного цикла наращивания цепи на носителе \*

Операция	Растворители и реагенты	Время, мин
1. Промывка	Пиридин	4
2. »	Хлороформ	6
3. Деблокирование	3% CF <sub>3</sub> COOH в 1,2-дихлорэтане	6
4. Промывка	Хлороформ	6
5. »	Пиридин	2
6. »	Абс. пиридин	10
7. Наращивание цепи	(I), MS, MeIm, абс. пиридин или (II), TPS, MeIm, абс. пиридин	90-120 120
8. Промывка	Абс. пиридин	4
9. Кэпирование	MeIm, (CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O, абс. пиридин	30

\* (I) — [(MeO)<sub>2</sub>Tr]N-P(O)(OCiPh)OH, (II) — [(MeO)<sub>2</sub>Tr]N-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, N=T, bzC, bzA, ibG.

Оказалось, что носители на основе C-120 и CPG дают близкие выходы (средний выход на стадии конденсации по (Tr)<sub>3</sub>T составляет 83%), а носитель на основе C-80 дает еще более высокий выход (87%). На этом носителе в автоматическом режиме был синтезирован декадезоксирибонуклеотид АСТГТССГСТ. Последовательность и продолжительность операций аналогичны приведенным в табл. 2 (кроме времени конденсации, которое составляло для каждой стадии 1,5 ч). Наращивание олигонуклеотидной цепи проводилось фосфотриэфирным методом с использованием мономерных блоков (I), активированных смесью мезитилсульфонилхлорида и метилимидазола. После отщепления олигодезоксирибонуклеотида от носителя, полного деблокирования и ионообменной ВЭЖХ (рис. 3) было выделено 4,3% АСТГТССГСТ, структура которого подтверждена по методу Максама — Гилберта [12].

Неожиданно низкий выход на 1-й стадии конденсации (26% по (MeO)<sub>2</sub>TrOH) получен с носителем на основе C-40 МК. В работах по твердофазному методу синтеза трудности протекания первых стадий конденсации связывают с влиянием стерических факторов, обусловленных размером пор [13]. Однако в случае носителя на основе C-40 МК резкое снижение выхода на 1-й стадии конденсации нельзя объяснить только стерическими факторами, так как по основным физическим параметрам (величина удельной поверхности, средний диаметр пор) он близок к носителю на основе C-80, при использовании которого получен высокий выход (88% по (MeO)<sub>2</sub>TrOH) \*.



\* Установление зависимости между физическими параметрами носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и их химическими свойствами будет предметом отдельного сообщения.

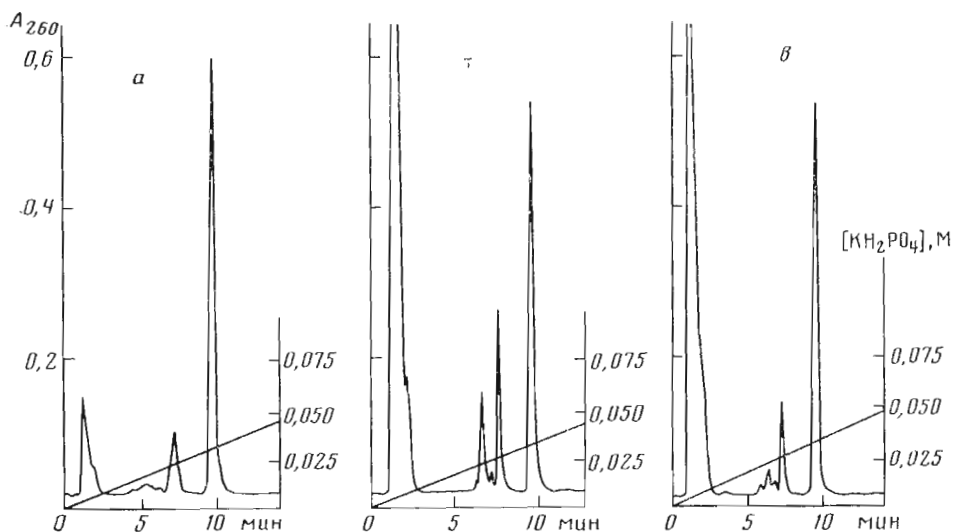


Рис. 2. Анализ реакционной смеси (после удаления всех защитных групп) при получении  $(Tr)_3T$  на носителе на основе силикагеля С-80 (а), С-40 МК (б, в — с удлиненной спейсерной группой) с помощью ВЭЖХ (колонка с Partisil 10 SAX ( $3,2 \times 250$  мм), градиент концентрации  $KH_2PO_4$  (0—0,3 М, рН 6,5) в 30%  $CH_3CN$ , скорость элюции 1 мл/мин)

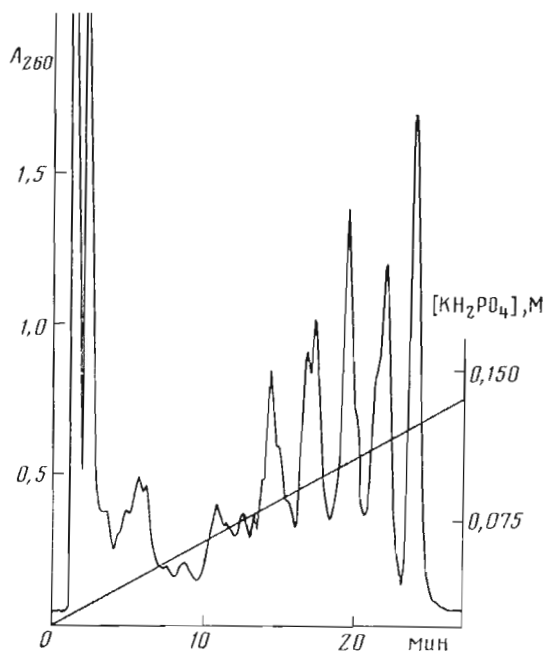


Рис. 3. Ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси при получении АСТГТССГСТ (после удаления всех защитных групп). Условия ВЭЖХ см. подпись к рис. 2, градиент  $KH_2PO_4$  0,02—0,3 М

Для повышения выходов первых стадий увеличивают либо время конденсации в начале синтеза (по сравнению с последующими стадиями) [8], либо длину спейсерной группы (расстояние между нуклеозидным звеном и носителем) [14]. Мы применили второй подход для модификации свойств носителя на основе С-40 МК. Синтетические методы, используемые для этой цели, требуют дорогостоящих исходных реагентов и длительных по времени реакций [14]. Предлагаемый нами простой способ удлинения спейсерной группы изображен на схеме. Он заключается в обработке носителя, содержащего якорные  $OH$ - или  $NH_2$ -группы, 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцинатом, триизопропилбензолсульфонилхло-

ридом и метилимидазолом (в соотношении 1:3:9) в абс. пиридине в течение 2 ч и кэпирования оставшихся OH- или NH<sub>2</sub>-групп с помощью смеси MeIm — уксусный ангидрид — абс. пиридин (в объемном соотношении 1:2:10; 30 мин). После детритилирования процедуру повторяют 2—3 раза до достижения постоянного выхода, определяемого спектрофотометрически по (MeO)<sub>2</sub>TrOH, затем присоединяют производное (II), которое принимают за первое нуклеозидное звено и рассчитывают по нему выходы в реакциях конденсации.

По этой методике из носителя на основе С-40 МК, содержащего ковалентно присоединенный остаток 5'-О-диметокситритилтимидина, после 2-кратной обработки в условиях, приведенных в табл. 2 (операции № 1—9), был получен новый носитель, условно обозначенный нами С\*-40 МК. На нем был синтезирован тетрагимидинтрифосфат (Tr)<sub>3</sub>T в условиях, описанных в табл. 2 (операции № 1—7). Сравнение выходов в реакциях конденсации, полученных на двух носителях на основе С-40 МК (табл. 1), позволяет сделать вывод, что увеличение длины спейсерной группы значительно улучшило свойства носителя С-40 МК. Следует подчеркнуть, что основными достоинствами предлагаемого нами способа являются его быстрота (продолжительность одного цикла ~3 ч), доступность и универсальность используемого реагента (5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцинат применяется как для удлинения спейсерной группы, так и для присоединения первого нуклеозида к носителю), легкость контроля каждой стадии наращивания (по диметокситритилкарбинолу) и возможность автоматизации.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют сделать вывод о том, что носители, полученные на основе силикагеля марки «Силохром» (С-80, С-120), соответствуют требованиям, предъявляемым к полимерным носителям, не уступают известным носителям на основе пористого стекла с контролируемым размером пор и могут оказаться весьма полезными для автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Увеличение длины спейсерной группы осуществляется простым эффективным способом и приводит к значительному улучшению свойств носителя.

### Экспериментальная часть

В работе использовали дезокси-нуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск), силикагель марки «Силохром» отечественного производства, пористое стекло с контролируемым размером пор, содержащее якорные аминогруппы Aminopropyl/CPG (Pierce, США), N-метилимидазол, мезитиленсульфонилхлорид, триизопропилбензолсульфонилхлорид, N',N'-дициклогексилкарбодимид, аминопропилтриэтоксисилан, триметилхлорсилан (Fluka, Швейцария).

Защищенные нуклеозид-3'-фосфаты получали по методу, описанному в работе [15]. 5'-О-Диметокситритилтимидин-3'-О-сукцинат получен по методике [1]. Модификацию носителей и иммобилизацию первого нуклеозидного звена осуществляли по аналогии с работой [10]. Нагрузку носителей определяли спектрофотометрически по (MeO)<sub>2</sub>TrOH ( $\epsilon_{295} = 71\,700$  в смеси HClO<sub>4</sub> — C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 3:2) [16].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов и увеличение длины спейсерной группы проводили в реакторе колоночного типа на установке для автоматического синтеза олигонуклеотидов «Виктория-2» (производство СКТБ СЭ и АП СО АН СССР, Новосибирск) с модифицированной гидравлической схемой с помощью блока электронного управления.

Ионообменную ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex (США), модель 322, на колонке (3,2×250 мм) с Partisil 10 SAX (Whatman, Англия).

Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр Perkin — Elmer 550 (США).

*Иммобилизация первого нуклеозидного звена.* Смесь 2 г силикагеля (С-40 МК, С-80 или С-120) и 2 мл аминопропилтриэтоксисилана в 20 мл сухого толуола кипятили 4—5 ч, оставляли на 14 ч при 20° С, затем кипятили дополнительно 10 ч. Носитель отфильтровывали, промывали толуолом

(3×10 мл), этанолом (4×10 мл), эфиром (4×10 мл) и высушивали в вакуум-эксикаторе.

К 2 г носителя (на основе С-40 МК, С-80, С-120 или СРГ), содержащего якорные аминогруппы, прибавляли 10 мл абс. пиридина, 2 г янтарного ангидрида, 0,2 г диметиламинопиридина и встряхивали смесь в течение 2 ч. Носитель отфильтровывали, промывали пиридином (3×10 мл), этанолом (4×20 мл), абс. пиридином (4×10 мл). К полученному носителю прибавляли 7 мл абс. пиридина и 2 мл триметилхлорсилана, смесь встряхивали 4 ч и оставляли на 24 ч при 20° С. Носитель отфильтровывали, промывали пиридином (4×10 мл), этанолом (3×10 мл), абс. пиридином (4×10 мл). Смесь полученного носителя, содержащего якорные карбоксигруппы, 0,5 г 5'-О-диметокситригитимидина, 1 г дициклогексилкарбодиимида и 0,1 г диметиламинопиридина в 5 мл абс. пиридина встряхивали в течение 5 ч и оставляли на 24 ч при 20° С, прибавляли 2 мл метанола, встряхивали 2 ч и оставляли на 12 ч при 20° С. Носитель промывали пиридином (4×10 мл), этанолом (3×10 мл), тетрагидрофураном (8×10 мл), этанолом (3×10 мл) и эфиром (3×10 мл).

Количество иммобилизованного нуклеозида определяли по  $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$  [16] (см. табл. 1).

*Проведение одного цикла на полимерном носителе.* Навеску носителя, содержащую 3–7 мкмоль 5'-О-диметокситригитимидина, помещали в реактор установки «Виктория-2». Через реактор пропускали растворители (хлороформ, пиридин, абс. пиридин) или раствор 3%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в 1,2-дихлорэтаноле со скоростью 100 мл/ч. Последовательность и время пропускания программировались с помощью блока электронного управления и указаны в табл. 2. Элюаты детритилирующего раствора и следующего за ним хлороформа собирали для определения количества  $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$ . Перед каждой следующей операцией носитель освобождали от растворителя (или раствора) пропусканием через реактор осушенного воздуха в течение 10 с. После промывки носителя абс. пиридином и выдавливания растворителя осушенным воздухом в реактор подавали 0,1–0,15 М раствор нуклеотида (I) или (II), 9 экв. N-метилимидазола, предварительно высушенных азетропным упариванием с абс. пиридином (3×3 мл), и 3 экв. арилсульфохлорида в абс. пиридине (0,2–0,3 мл). Избыток производного (I) или (II) в расчете на первое нуклеозидное звено составил 5–6 экв. Носитель с этим раствором выдерживали 90–120 мин, изредка встряхивая. Далее перечисленные операции повторяли необходимое число раз в соответствии с табл. 2 (операции № 1–7). При увеличении длины спейсерной группы после конденсации в течение 120 мин носитель промывали абс. пиридином (4 мин) и после выдавливания растворителя осушенным воздухом в реактор подавали 0,26 мл смеси N-метилимидазола, уксусного ангидрида и абс. пиридина (1 : 2 : 10) и выдерживали носитель с этим раствором 30 мин без перемешивания. После этого повторяли перечисленные операции в соответствии с табл. 2.

*Деблокирование и выделение олигонуклеотидов.* После проведения последней стадии конденсации носитель промывали пиридином (6 мин) и обрабатывали 5 мл смеси конц. аммиак — пиридин (9 : 1) в течение 72 ч при 20° С. Носитель отфильтровывали и промывали 50% спиртом (3×3 мл) и водой (3×3 мл). Объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток обрабатывали 80% уксусной кислотой (3 мл) в течение 30 мин при 20° С. Анализ реакционных смесей и выделение деблокированных олигонуклеотидов, тетраимидинтрифосфата и декадезоксирибонуклеотида АСТГТССГСТ проводили методом ионообменной ВЭЖХ на колонке с Partisil 10 SAX. Градиент концентрации калий-фосфатного буфера (рН 6,5) в 30% ацетонитриле составлял 0–0,3 М для  $(\text{Tr})_3\text{T}$  и 0,02–0,3 М для АСТГТССГСТ (скорость элюции 1 мл/мин).

Выходы  $(\text{Tr})_3\text{T}$ , полученные на различных носителях, приведены в табл. 1. Фракцию, содержащую декадезоксирибонуклеотид, полученную после ионообменной ВЭЖХ, обессоливали на колонке (3,2×250 мм) с Lichrosorb RP-18 в градиенте ацетонитрила (5–20%) в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере (скорость элюции 1 мл/мин). Выход АСТГТССГСТ

составил 4,3%. Последовательность нуклеотидов в АСТГТССГСТ подтверждена анализом по методу Максама — Гилберта.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 5, p. 1081—1096.
2. Сивяков А. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г. *Биоорган. химия*, 1983, т. 10, № 1, с. 68—74.
3. Kohli V., Balland A., Wintzerith M., Sauerwald R., Staub A., Lecocq J. P. *Nucleic Acids Res.*, 1982, v. 10, № 22, p. 7439—7448.
4. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. *Nucleic Acids Res.*, 1983, v. 11, № 23, p. 8369—8387.
5. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. П. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 5, с. 706—710.
6. Köster H., Stumpe A., Wolter A. *Tetrahedron Lett.*, 1983, v. 24, № 8, p. 747—750.
7. Crea R., Horn T. *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 10, p. 2331—2348.
8. Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Orezkaya T. S., Kupriyanova E. A., Shabarova Z. A. *Tetrahedron Lett.*, 1983, v. 26, № 16, p. 1691—1694.
9. Cough G. R., Brunden M. J., Gilham P. T. *Tetrahedron Lett.*, 1983, v. 24, № 48, p. 5321—5324.
10. Matteucci M. D., Caruthers M. H. *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, № 8, p. 719—722.
11. Попанов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарыгова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова З. А., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 6, с. 1386—1389.
12. Mazam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.
13. Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K. *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 22, p. 5507—5517.
14. Kume A., Sekine M., Hata T. *Chemistry Lett.*, 1983, № 10, p. 1597—1600.
15. Сивяков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 490—498.
16. Ohtsuka E., Takashima H., Ikehara M. *Tetrahedron Lett.*, 1982, v. 23, № 30, p. 3081—3084.

Поступила в редакцию  
23.X.1984  
После доработки  
22.III.1985

#### AUTOMATED SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES. I. A STUDY OF SOLID SUPPORTS BASED ON SILICA GEL «SILOCHROM»

ЛОМАКИН А. И., ЯСТРЕБОВ С. И., ПОПОВ С. Г.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,  
Novosibirsk region

Some new silica gel supports based on «Silochrom» have been prepared, and one of them used for synthesis of decadeoxyribonucleotide dACTGTCCGCT by automated phosphotriester solid phase method. To improve properties of the support, a simple and effective method for extension of the spacer between the nucleoside and the support is proposed.