



УДК 547.963.32:542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
III *. ИССЛЕДОВАНИЕ НОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЕЙ
МАРКИ «СИЛОХРОМ» И «СИЛИПОР»

Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Для автоматического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов получены носители на основе силикагелей марки «Силохром» и «Силипор» с большой нагрузкой по первому нуклеозиду (130–208 мкмоль/г) и исследованы их свойства. Быстрый способ увеличения длины спейсерной группы с помощью N-защипленной 6-аминокапроновой кислоты позволяет сохранить высокую нагрузку нуклеозида и приводит к значительному улучшению свойств носителей.

Полимерные неорганические носители на основе силикагеля широко используются в твердофазном синтезе олигонуклеотидов как фосфотриэфирным [2–3], так и фосфитным [4–5] методами. Носители этого типа получают, как правило, из силикагелей для высокоэффективной жидкостной хроматографии с близкими физическими параметрами: величина удельной поверхности изменяется в пределах 100–300 м²/г, средний диаметр пор 15–40 нм. Несмотря на достаточно большую величину удельной поверхности, достигаемая нагрузка по первому нуклеозиду на этих носителях обычно невысока (25–60 мкмоль/г), а плотность покрытия поверхности, рассчитанная по количеству введенного нуклеозида, не превышает 0,5 мкмоль/м². Недавно мы сообщали [6] о получении носителей на основе силикагеля марки «Силохром», которые по физическим параметрам оказались сравними с силикагельными носителями, обычно используемыми в твердофазном синтезе олигонуклеотидов.

Одной из актуальных задач является повышение экономичности синтеза олигонуклеотидов (уменьшение расхода реагентов и растворителей), в частности, за счет увеличения количества первого нуклеозида на носителе. Достижимое при этом уменьшение объема носителя в реакторе может привести также к сокращению продолжительности промывок и ускорению синтеза в целом. Так, по нашим данным, при использовании автоматической установки «Виктория-2» продолжительность промывок в одном цикле наращивания цепи может быть уменьшена в 1,5–2 раза при переходе от 100–150 к 25–40 мг носителя. В настоящей работе исследована возможность увеличения количества первого нуклеозида на примере силикагелей «Силохром» С-80, «Силипор-200» (СП-200), «Силипор-400» (СП-400) и «Силипор-600» (СП-600) и проверены свойства полученных носителей.

Ранее мы сообщали [6] о возможности использования смеси TPS (или MS) и MeIm для активации карбоксильной группы нуклеозид-3'-О-сукцината в реакции присоединения его к силикагелю, содержащему якорные OH- или NH₂-группы. Силикагель «Силохром» С-80, содержащий аминопропильные группы, обрабатывали смесью 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината, MS и MeIm; оставшиеся NH₂-группы блокиро-

* Сообщение II см. [1]. Принятые сокращения: ClPh – *n*-хлорфенил, TPS – триизопропилбензолсульфонилхлорид, MS – мезитиленсульфонилхлорид, MeIm – *N*-метилимидазол, βAla – 3-аминопропионовая кислота, εAbx – 6-аминокапроновая кислота. Префикс «d» (дезокс) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

Карта операций для введения первого нуклеозида и одного цикла наращивания цепи

№ п. п.	Операция	Растворители и реагенты	Время, мин
1	Промывка	Абс. пиридин	2×4
2	Введение нуклеозида	(MeO) ₂ Tr-T-C(O)(CH ₂) ₂ COOH, MS, MeIm в абс. пиридине	60
3	Промывка	Абс. пиридин	5
4	Блокирование NH ₂ -групп	(CH ₃ CO) ₂ O, MeIm в абс. пиридине	10
5	Промывка	Пиридин	2×2
6	»	Хлороформ	2×3
7	Деблокирование	3% CF ₃ COOH в дихлорэтано	3×2
8	Промывка	Хлороформ	2×3
9	»	Пиридин	2×1
10	»	Абс. пиридин	2×4
11	Наращивание цепи	(MeO) ₂ Tr-Tr (ClPh), MS, MeIm в абс. пиридине	90

Таблица 2

Основные параметры носителей и выходы на стадиях

Носитель	Удельная поверхность, м ² /г	Средний диаметр пор, нм	Нагрузка нуклеозида, мкмоль/г	Средняя плотность покрытия поверхности, мкмоль/м ²	Выходы по (MeO) ₂ TrOH		
					Стадия I	Стадия II	Стадия III
C-80	70–100	40–60	132	1,6	75	85	85
СП-200	250–340	20	208	0,7	54	80	80
СП-400	350–490	17	130	0,3	46	59	67
СП-600	500–700	14	127	0,2	45	41	27
βAla-(C-80)	70–100	40–60	103	1,2	83	77	90
(βAla) ₂ -(C-80)	70–100	40–60	90	1,1	81	87	80
εAhx-(C-80)	70–100	40–60	108	1,3	80	87	82
(εAhx) ₂ -(C-80)	70–100	40–60	83	1,0	89	89	92

вали с помощью уксусного ангидрида и MeIm в абс. пиридине. Все промывки носителя и деблокирование 3% раствором трифторуксусной кислоты в дихлорэтано осуществляли на установке «Виктория-2» в автоматическом режиме. Последовательность и продолжительность операций указаны в табл. 1 (операции 1–8). Нагрузку нуклеозида определяли по количеству (MeO)₂TrOH, содержащегося в объединенных элюатах операций 7–8 (табл. 1). Для силикагеля «Силохром» C-80 она составляла 132 мкмоль на 1 г носителя, т. е. оказалась примерно в 3 раза выше, чем описано ранее [6]. Смесь TPS и MeIm уже использовалась для активации карбоксильной группы, ковалентно связанной с полимерным носителем, однако нагрузка первого нуклеозида была ниже и изменялась в широком интервале (50–100 мкмоль) [2].

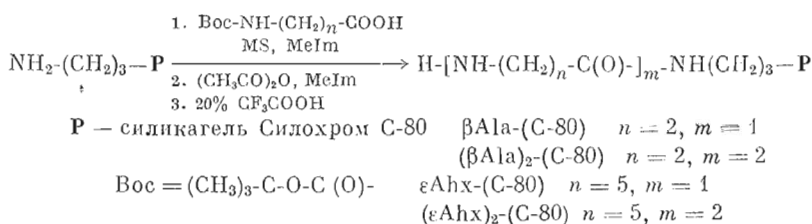
Можно было ожидать, что для силикагелей с большей, чем у C-80, величиной удельной поверхности нагрузка нуклеозида будет возрастать, как это наблюдалось, например, для носителей на основе пористого стекла [7]. Мы получили ряд носителей, содержащих якорные аминпропильные группы, из силикагелей марки «Силипор» (ЧССР) СП-200, СП-400, СП-600, величина удельной поверхности которых изменяется от 250 до 700 м²/г (табл. 2). Введение первого нуклеозида осуществляли в условиях, описанных выше (табл. 1, операции 1–8). Оказалось, что если для носителя СП-200, величина удельной поверхности которого в 3 раза больше, чем у C-80, нагрузка первого нуклеозида возросла по сравнению с силикагелем C-80 и составила 208 мкмоль/г, то для носителей СП-400 и СП-600, имеющих еще большую величину удельной поверхности, количество первого нуклеозида не превышало 130 мкмоль/г (табл. 2). Срав-

нение средних плотностей покрытия поверхности для носителей С-80, СП-200, СП-400 и СП-600, рассчитанных по количеству первого нуклеозида, показывает, что они уменьшаются с ростом величин удельной поверхности.

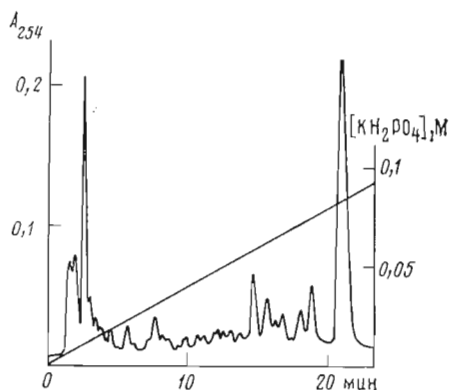
Для проверки свойств полученных носителей на них проводили три цикла наращивания цепи с помощью смеси 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-*п*-хлорфенилфосфата, MS и MeIm. Карта операций одного цикла приведена в табл. 1 (операции 5—11). Выходы на стадиях, определенные по количеству $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$, приведены в табл. 2. Для носителя С-80 с высокой нагрузкой нуклеозида (132 мкмоль/г) выходы на первых стадиях (75 и 85%) оказались ниже, чем это наблюдалось для силикагеля С-80 с низкой нагрузкой нуклеозида (42 мкмоль/г), для которого выходы на первых стадиях конденсации составляли 88 и 92% [6]. Этот факт можно объяснить влиянием стерических факторов, вызванных увеличением количества функциональных групп на единицу поверхности носителя (средняя плотность покрытия поверхности по первому нуклеозиду составляет 1,6 мкмоль/м² для высоконагруженного силикагеля С-80 и 0,5 мкмоль/м² для С-80 с низкой нагрузкой нуклеозида).

Недавно мы показали [6], что увеличение длины спейсерной группы носителей с помощью 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината позволяет улучшить выходы на первых стадиях конденсации, однако использование этого реагента заметно снижает нагрузку нуклеозида на носитель. Чтобы сохранить высокую нагрузку нуклеозида, мы решили увеличить длину спейсерной группы на силикагеле С-80 с помощью N-защищенных аминокислот, как это делалось, например, для полиакриламидных гелей [8]. Силикагель С-80, содержащий якорные аминопропильные группы, обрабатывали раствором N-защитенной аминокислоты (3-N-*трет*-бутилоксикарбониламинопропионовой или 6-N-*трет*-бутилоксикарбониламинокапроновой), активированной смесью MS и MeIm, оставшиеся аминогруппы блокировали уксусным ангидридом. После удаления *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы 20% раствором трифторуксусной кислоты в хлороформе часть носителя повторно модифицировали с помощью подходящей N-защитенной аминокислоты. Таким образом, были получены четыре образца силикагеля С-80 с разной длиной спейсерной группы (схема). Введение первого нуклеозида и проверку свойств полученных носителей проводили в реакторе установки «Виктория-2» в условиях, описанных выше (табл. 1). Сравнение выходов на стадиях конденсации (табл. 2), определенных по количеству $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$, показывает, что самым лучшим из исследованных образцов оказался носитель, полученный после двукратной обработки силикагеля С-80 6-N-*трет*-бутилоксикарбониламинокапроновой кислотой. Этот носитель, имея достаточно большую нагрузку первого нуклеозида, показал стабильно высокие выходы (~90%) на стадиях конденсации. В случае трех других образцов носителей некоторое уменьшение выхода на 2-й и 3-й стадиях конденсации частично может быть следствием непостоянства условий реакции, однако не связано с недостатками в конструкции синтезатора. В предварительных экспериментах, предшествовавших работе [6], по освоению автоматической установки «Виктория-2» с модифицированной гидравлической схемой мы повторяли отдельные опыты по проверке свойств носителей на основе пористых стекол и силикагелей «Спяхром» для подтверждения корректности величин выходов на стадиях. Определенная на основании этих экспериментов ошибка не превышала 2%, что привело нас к убеждению в высокой надежности установки «Виктория-2» в достижении постоянных условий реакции.

По нашему мнению, наблюдаемые эффекты могут быть связаны со свойствами самого носителя, например его микроструктурой (наличием микропор), длиной спейсерной группы, которая может быть недостаточна для данного носителя. Эти предположения подтверждаются при сравнении выходов на стадиях конденсации, полученных для носителей $(\beta\text{Ala})_2$ -С-80 и ϵAlx -С-80 (см. табл. 2): выходы на каждой из трех стадий для них очень близки, так как длины спейсерных групп также близки.



Необходимо отметить, что 6-аминокапроновая кислота представляется очень удобным реагентом для быстрого увеличения длины спейсерной группы. Стадию присоединения ее к носителю легко автоматизировать,



Типичный профиль ионообменной ВЭЖХ реакционной смеси, полученной в синтезе олигонуклеотида GATCTCAGC на носителе $(\epsilon\text{Ahx})_2-(\text{C}-80)$ после полного удаления всех защитных групп. Колонка (3,2×250 мм) с анионообменником [12], градиент 0,02–0,3 М KH_2PO_4 (pH 6,5) в 30% ацетонитриле. Скорость элюции 1,5 мл/мин

однако удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы требует введения новых реагентов (20% трифторуксусная кислота в хлороформе) в условиях, описанных в табл. 1. Мы заменили *трет*-бутилоксикарбонильную NH_2 -защитную группу в 6-аминокапроновой кислоте диметокситритильной, удаление которой осуществляется с помощью 3% трифторуксусной кислоты в дихлорэтано (табл. 1). Кроме того, применение диметокситритильной NH_2 -защитной группы позволяет легко определить количество функциональных NH_2 -групп после каждой стадии удлинения спейсерной группы с помощью 6-аминокапроновой кислоты. Для силикагеля С-80, содержащего аминопропильные группы, присоединение 6-N-диметокситритиламинокапроновой кислоты проходило с высокими выходами: количество NH_2 -групп, определенное по $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$, составило

184 мкмоль/г после введения первого остатка 6-аминокапроновой кислоты и 170 мкмоль/г после введения второго остатка. В результате последующего присоединения первого нуклеозида с помощью подходящего 5'-О-диметокситритилнуклеозид-3'-О-сукцината в условиях, описанных выше, были получены носители, содержащие 98 мкмоль Т, 98 мкмоль bzC, 96 мкмоль bzA и 93 мкмоль ibG (на 1 г носителя).

Эти носители успешно использовались нами в автоматическом синтезе трех олигодезоксирибонуклеотидов в условиях, аналогичных приведенным в табл. 1. После выделения олигонуклеотидов методом анионообменной ВЭЖХ (пример выделения одного из них приведен на рисунке) было получено 18% GATCTCAGC, 22% GCGTTCCTTC и 12% AATTGGATCAT в расчете на первое звено, присоединенное к носителю. Последовательность нуклеотидов в полученных олигомерах подтверждена методом Максама — Гилберта. Экспериментальные подробности этой работы будут опубликованы позднее.

В случае силикагелей марки «Силипор» СП-200, СП-400, СП-600 сравнение выходов на стадиях конденсации (табл. 2) показывает, что уменьшение среднего диаметра пор носителей приводит к резкому ухудшению их свойств. На основании полученных выше результатов, а также данных работы [3] можно ожидать, что удлинение спейсерной группы на этих носителях позволит увеличить выходы на стадиях конденсации, причем длина спейсерной группы для носителей СП-200 и СП-400 должна быть больше, чем для С-80. Выходы на стадиях конденсации, полученные на носителе СП-600, позволяют нам сделать вывод о его непригодности для олигонуклеотидного синтеза.

Таким образом, в настоящей работе получены носители для автоматического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на основе силикагелей марки «Силохром» и «Силипор» с высокой нагрузкой первого нуклеозида (130–208 мкмоль/г) и проверены их свойства. На примере силикагеля «Силохром» С-80 исследованы способы увеличения длины спейсерной группы с помощью различных реагентов (N-защитенных 3-аминопропионовой и 6-аминокапроновой кислот). Показано, что 6-N-диметокситриетиламинокапроновая кислота является удобным реагентом для быстрого удлинения спейсерной группы, позволяет сохранить высокую нагрузку первого нуклеозида и заметно улучшает свойства носителей.

Экспериментальная часть

В работе использованы силикагель «Силохром» С-80 и 6-аминокапроновая кислота отечественного производства, силикагель «Силипор-200», «Силипор-400», «Силипор-600» (ЧССР), 3-аминопропионовая кислота (Reanal, ВНР), N-метилимидазол (Fluka, Швейцария).

Ангидрид *трет*-бутилоксикарбоновой кислоты получали по методике [9], N-*трет*-бутилоксикарбониламинокислоты синтезировали по методу, описанному в работе [10].

Модификацию носителей с целью получения якорных аминопропильных групп осуществляли по методике [4]. Введение первого нуклеозида и реакции конденсации на носителях осуществляли в реакторе колоночного типа установки «Виктория-2» с модифицированной гидравлической схемой [6] с помощью блока электронного управления.

Другие реагенты и методы эксперимента аналогичны описанным ранее в работах [6, 11].

Получение 1М раствора 6-N-диметокситриетиламинокапроновой кислоты. Смесь 1,31 г (10 ммоль) 6-аминокапроновой кислоты и 4,06 г (12 ммоль) диметокситритилхлорида в 30 мл абс. пиридина встряхивали 20 мин при 50°С до полного растворения реагентов, раствор выдерживали 2 ч при 20°С. После разложения реакционной смеси добавлением 80 мл 0,1 М триэтиламмонийбикарбоната продукт экстрагировали диэтиловым эфиром (150 мл). Эфирную вытяжку промывали 0,1 М триэтиламмонийбикарбонатом (2×80 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄, упаривали с добавлением пиридина. Остаток после упаривания растворяли в 10 мл абс. пиридина, полученный раствор использовали для удлинения спейсерной группы силикагельных носителей.

Увеличение длины спейсерной группы на силикагеле С-80 с помощью N-трет-бутилоксикарбониламинокислот. Смесь 1 г силикагеля С-80, содержащего якорные аминопропильные группы, 1 ммоль N-трет-бутилоксикарбониламинокислоты (3-аминопропионовой или 6-аминокапроновой) и 9 ммоль N-метилимидазола высушивали упариванием с абс. пиридином (3×10 мл), прибавляли 10 мл абс. пиридина и 0,65 г (3 ммоль) мезитиленсульфонилхлорида. Смесь встряхивали 1 ч, прибавляли 1 мл уксусного ангидрида и встряхивали еще 15 мин. Носитель отфильтровывали, промывали пиридином (3×10 мл), этанолом (3×10 мл) и хлороформом (3×10 мл). Для удаления трет-бутилоксикарбонильной защитной группы к носителю прибавляли 20% раствор трифторуксусной кислоты в хлороформе (10 мл), смесь встряхивали 20 мин. Носитель отфильтровывали, промывали хлороформом (5×10 мл), 5% раствором триэтиламина в хлороформе (3×10 мл), хлороформом (5×10 мл) и пентаном (2×10 мл), высушивали в вакуум-экстенкаторе.

Часть полученного носителя (~0,7 г) повторно модифицировали с помощью подходящей N-трет-бутилоксикарбониламинокислоты.

Увеличение длины спейсерной группы на силикагеле С-80 с помощью 6-N-диметокситриетиламинокапроновой кислоты проводили по аналогии с описанной выше методикой, используя для удаления диметокситритильной защитной группы 3% раствор трифторуксусной кислоты в дихлорэтаноле (2×3 мин). Количество NH₂-групп, определенное по (MeO)₂TrOH,

составило 184 мкмоль/г после введения первого остатка 6-N-ампиокапроновой кислоты и 170 мкмоль/г после введения второго остатка.

Иммобилизация первого нуклеозида и проведение циклов наращивания цепи на носителе. Навеску носителя (50 мг), содержащего якорные аминогруппы, помещали в реактор установки «Виктория-2». Через реактор пропускали абс. пиридин со скоростью 100 мл/ч (2×4 мин), растворитель выдавливали осушенным воздухом (10 с) и в реактор с помощью шприца подавали 0,1–0,15 М раствор 5'-О-диметокситритилтимидин-3'-О-сукцината, N-метилимидазола (9 экв.), предварительно высушенных азеотропным упариванием с абс. пиридином (3×3 мл), мезитиленсульфонилхлорида (3 экв.) в абс. пиридине (0,2–0,3 мл). Носитель с этим раствором выдерживали 60 мин, изредка встряхивая, и промывали 5 мин абс. пиридином. После выдавливания растворителя осушенным воздухом в реактор подавали смесь N-метилимидазол — уксусный ангидрид — абс. пиридин, 1:2:10 (0,26 мл) и выдерживали носитель с этим раствором 10 мин без перемешивания. Через реактор пропускали растворители (хлороформ, пиридин) или 3% раствор трифторуксусной кислоты в дихлорэтане со скоростью 100 мл/ч. Последовательность и время пропускания указаны в табл. 1 (операции 5–9). Элюаты детритилирующего раствора и хлороформной промывки (операции 7–8) собирали для определения количества $(\text{MeO})_2\text{TrOH}$. Перед каждой следующей операцией носитель освобождали от предыдущего растворителя (или раствора), пропуская через реактор осушенный воздух в течение 10 с. После промывки носителя абс. пиридином и выдавливания растворителя осушенным воздухом в реактор подавали 0,1–0,15 М раствор $(\text{MeO})_2\text{Tr-Tr}(\text{ClPh})$, N-метилимидазола (9 экв.), предварительно высушенных азеотропным упариванием с абс. пиридином, и мезитиленсульфонилхлорида (3 экв.) в абс. пиридине (0,2–0,3 мл). Носитель с этим раствором выдерживали 90 мин, изредка встряхивая. Далее повторяли операции 5–11 (табл. 1).

Авторы выражают благодарность И. Н. Никоновой и Н. И. Радаевой за помощь в получении N-трет-бутилоксикарбониламинокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломакин А. И., Попов С. Г. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 927–933.
2. Ejimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369–8387.
3. Kume A., Sekine M., Hata T. Chemistry Lett., 1983, № 30, p. 1597–1600.
4. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185–3191.
5. Dorman M. A., Noble S. A., McBride L. J., Caruthers M. H. Tetrahedron, 1984, v. 40, № 1, p. 95–102.
6. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920–926.
7. Köster H., Biernat J., McManus J., Wolter A., Stumpe A., Narang C. K., Sinha N. D. Tetrahedron, 1984, v. 40, № 1, p. 103–112.
8. Gait M. J., Mathes H. W., Sing M., Sproat B. S., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6243–6254.
9. Позднеев В. Ф., Смирнова Е. А., Подгорнова Н. Н., Зенцова И. К., Калей У. О. Журн. орган. химии, 1979, т. 15, № 1, с. 106–109.
10. Позднеев В. Ф. Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1605–1610.
11. Силияков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 490–498.
12. А. с. № 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.12.83, № 8670634. Опубл. в Б. И., 1985, № 17.

Поступила в редакцию
22.V.1985
После доработки
15.VII.1985

AUTOMATED SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES.
III. STUDY OF THE SOLID SUPPORTS BASED ON SILICA
GELS «SILOCHROM» AND «SILIPOR»

LOMAKIN A. I., YASTREBOV S. I., POPOV S. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

Several silica gel supports with high contents of the first nucleoside (about 130–208 μ mole per gramm) have been prepared and their properties studied. The mixture of N-protected 6-aminocaproic acid, mesitylensulfonylchloride and N-methylimidazole was used for rapid extension of the spacer between the nucleoside and support.