



УДК 547.963.32.057 : 542.95

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ТРИЭФИРНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ. КАТАЛИЗ АНИОНАМИ
АЗОЛОВ В ПРИСУТСТВИИ КРАУН-ЭФИРОВ***Синяков А. Н., Лебедев А. В.***Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.;***Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Триэфирный метод остается наиболее распространенным в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов. В ряде работ (см. обзор [1]) показано, что стадией, лимитирующей суммарную скорость триэфирной конденсации, является разложение промежуточного пирофосфата (I) (см. рис. 1). В качестве нуклеофильного катализатора, необходимого для ускорения этой стадии, были предложены азолы: тетразол [2], нитротриазол [3], N-метил-имидазол [4]. В работе [5] установлено, что скорость разложения пирофосфата (I) в присутствии тетразола увеличивается при добавлении триэтиламина, т. е. катализатором является анион тетразола. Эти данные побудили нас использовать в качестве катализатора «обнаженные анионы» нитротриазола [6] или тетразола.

Сначала была исследована реакция пирофосфатов (I) с нуклеозидом. Пирофосфат (Ia) $R = [(MeO)Tr]T$; $R' = PhCl$ получали обработкой $[(MeO)Tr]Tr(PhCl)$ мезитиленсульфотетразолидом в абс. пиридине (ср. [5]). Кинетику реакций изучали с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР. Оказалось, что скорость реакции пирофосфата (Ia) (0,1 M) с T (Ac) (0,1 M) в присутствии только сульфотетразолида (0,3 M) при 2° C мала. Так, за 5 мин концентрация динуклеозидфосфата (IIa) достигла лишь 0,025 M, за 10 мин — 0,04 M, за 40 мин — 0,08 M, что полностью соответствует ранее полученным данным [7]. Однако в присутствии нуклеофильного катализатора — смеси калиевой соли нитротриазола (0,2 M) и 18-краун-6 (0,2 M) — эта же реакция при 2° C заканчивается менее чем за 3 мин. Аналогичное увеличение скорости наблюдается при использовании в качестве нуклеофильного катализатора калиевой соли тетразола в присутствии 18-краун-6.

Мы предположили, что наблюдаемое ускорение связано с увеличением концентрации активного промежуточного соединения — тетразолида (III) или триазолида (IV). Образование и высокая реакционная способность такого интермедиата ранее были продемонстрированы в модельных экспериментах [5]. Однако непосредственно в реакционной смеси в присутствии арилсульфотетразолидов (или арилсульфотриазолидов) соединение (III) или (IV), по-видимому, из-за низкой концентрации ранее не регистрировалось. Для доказательства предположения об образовании активных интермедиатов к тетрафенилпирофосфату (Iб) $R = R' = Ph$ (он использован для упрощения интерпретации ЯМР-спектров) при 30° C добавили смесь калиевой соли тетразола и 18-краун-6. В первом же спектре, записанном через 2 мин после смешения реагентов (рис. 1а), кроме сигнала исходного пирофосфата (Iб) при -25,5 м.д. наблюдается сигнал при -21,5 м.д. Соотношение интенсивностей этих двух сигналов составляло 1 : 3 и с течением времени не изменялось. На основании литературных данных [5] соединению с сигналом при -21,5 м.д. можно приписать структуру (III).

Сокращения: Tet — тетразол; NTg — 3-нитро-1,2,4-триазол (нитротриазол); PhCl — 4-хлорфенил; Nuc — нуклеозид. Префикс d (дезокс) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

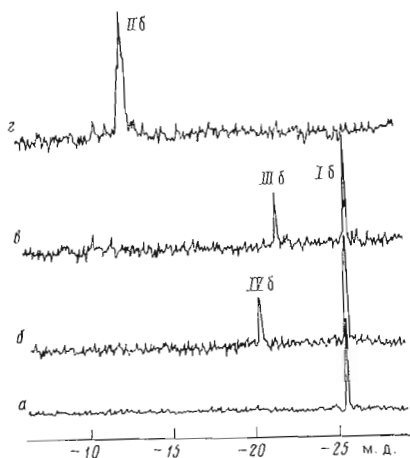


Рис. 1

Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР 0,05 М тетрафенилпирофосфата (а) и смеси через 2 мин после добавления к нему 18-краун-6 и 0,2 М К-соли тетразола (б) или 0,2 М нитротриазола (в); г — спектр записан через 4 мин после добавления к смеси (в) 0,2 М bzA(Bz). Химические сдвиги относительно 85% H_3PO_4

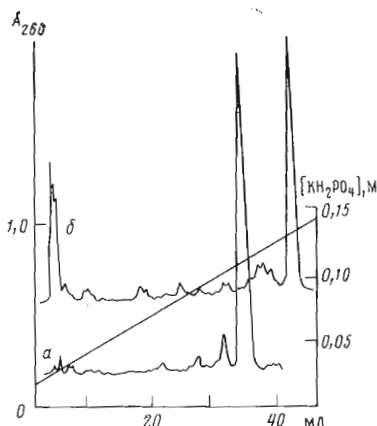
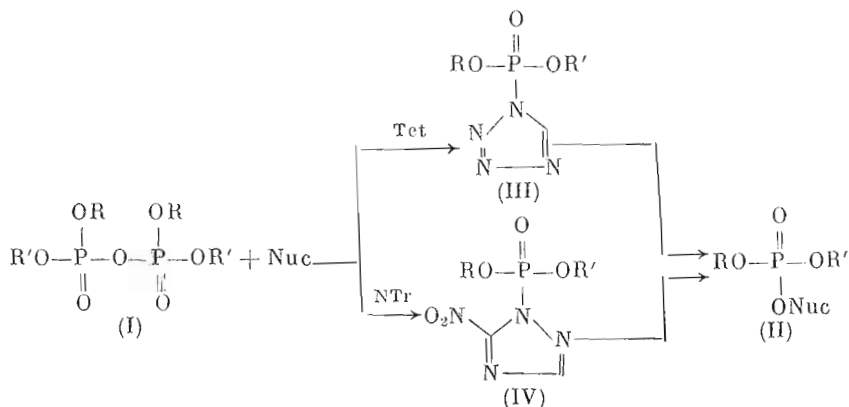


Рис. 2

Рис. 2. Профили ионообменной хроматографии при выделении олигонуклеотидов TTTTTTTTTT (а) и ATGGTTTTTC (б) на ионообменнике Partisil IOSAX (колодка $3,2 \times 250$ мм, хроматограф Altex (США), модель 322; градиент концентрации KH_2PO_4 в 30% CH_3CN в 0,05 М триэтиламмонийацетате, рН 6,8

При добавлении в реакционную смесь bzA(Bz) в спектре, записанном через 5 мин после смешения, регистрируется единственный сигнал продукта реакции (II) при $-12,2$ м. д. (рис. 1г). Полученные данные служат прямым экспериментальным подтверждением участия тетразолида (III) в качестве интермедиата в реакции триэфирного синтеза. Аналогично при действии на пирофосфат (Iб) калиевой соли нитротриазола и 18-краун-6 образуется триазолид (IV) (сигнал при $-20,6$ м.д.), причем соотношение (Iб) : (IV) составляет 4 : 1 (рис. 1б). При последующем добавлении в реакционную смесь bzA(Bz) уже через 4 мин в спектре ^{31}P -ЯМР наблюдается только сигнал продукта реакции (IIб) при $-12,2$ м.д.

Обнаруженное явление было использовано для увеличения скорости твердофазного фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов. Олигонуклеотидную цепь наращивали от 3'-к 5'-концу. Последовательность операций в цикле наращивания цепи 5'-О-диметокситригилпроизводными 3-*n*-хлорфениловых эфиров защищенных нуклеозидов (Р-компонент) на модифицированном силикагельном носителе [8], помещенном в 2-мл шприц с фильтром из пористого стекла: детритилирование 5% CCl_3COOH в дихлор-



а: R = [(MeO)Tr]T, R' = PhCl, Nuc = T(Ac)
 б: R = R' = Ph, Nuc = bzA(Bz)

этаноле (4 × 2 мл, 2 мин), промывка CHCl_3 (4 × 2 мл, 2 мин), промывка абс. пиридином (4 × 2 мл, 2 мин), обработка 0,1 М Р-компонентом, 0,3 М К-солью нитротриазола, 0,3 М 18-краун-6, 0,5 М мезитиленсульфонитротриазолидом (суммарный объем 0,5 мл, 5 мин), промывка CHCl_3 (4 × 2 мл, 2 мин). Конденсацию вели 5 мин, полное время одного цикла наращивания цепи составляло 15 мин. Защитные группы удаляли как описано в работе [4]. Профили ионообменной хроматографии при выделении олигонуклеотидов приведены на рис. 2. Выход деблокированных олигонуклеотидов в расчете на одну стадию удлинения цепи составил 92—93, 5%. Последовательность нуклеотидов в синтезированных олигомерах подтверждена методом Максама — Гилберта [9]. Таким образом, предложенный метод по скорости и выходу приближается к фосфитному методу синтеза олигонуклеотидов [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Zarytova V. F., Knorre D. G. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 4, p. 2091—2110.
2. Seth A. K., Jay E. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5445—5459.
3. Jones S. S., Rajner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. Tetrahedron, 1980, v. 36, № 21, p. 3075—3085.
4. Ефимов В. А., Реввердатто С. В., Чахмачева О. Г. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 231—238.
5. Зарытова В. Ф., Халимская Л. М., Ярмолинская Е. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1980, вып. 6, с. 78—86.
6. Сinyaков А. Н., Карпышев И. Н. Способ синтеза олигодезоксирибонуклеотидов. Заявка на авт. свид. № 3850742/23—04 от 6.XII.84 г. Положительное решение от 27.XI.85 г.
7. Ivanova E. M., Khalimskaya L. M., Romanenko V. P., Zarytova V. F. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 51, p. 5447—5450.
8. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920—926.
9. Maxam A. M., Gilbert M. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499—560.
10. Dorman M. A., Noble S. A., McBride L., Caruthers M. H. Tetrahedron, 1984, v. 40, № 1, p. 95—102.

Поступило в редакцию
8.1.1986

HIGHLY EFFECTIVE PHOSPHOTRIESTER METHOD FOR OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS. AZOLE-ANION CATALYSIS IN THE PRESENCE OF CROWN ETHERS

SINYAKOV A. N., LEBEDEV A. V.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kolt'sovo,
Novosibirsk Region

Potassium salts of tetrazole or 3-nitro-1,2,4-triazole in the presence of equimolar amounts of 18-crown-6] have been proposed as effective nucleophilic catalysts for the phosphotriester synthesis of oligodeoxyribonucleotides. ^{31}P -NMR spectroscopy data demonstrated that phosphotriazolides (tetrazolides) are the intermediates in the reaction of phosphotriester condensation. The newly developed catalytic combination potassium 3-nitro-1,2,4-triazolide — 18-crown-6 was used for preparation of two decanucleotide in high yield (92—93,5% per coupling cycle).