



УДК 547.963.32

СИНТЕЗ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА ТРИФТОРУКСУСНОГО АНГИДРИДА*

© 1996 г. В. С. Богачев[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск-90, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 11.03.96 г.

Разработан новый общий метод синтеза дезоксинуклеозидтрифосфатов основанный на реакции дезоксинуклеозидмонофосфатов с трифторуксусным ангидридом в апротонном растворителе в присутствии третичных аминов с последующей обработкой образующихся смешанных ангидридов дезоксинуклеозидмонофосфатов и трифторуксусной кислоты нуклеофильным катализатором (N-метилимидазолом, 4-N,N-диметиламинопиридином) и затем неорганическим пирофосфатом. Подобраны оптимальные условия синтеза, получены все четыре нуклеозидтрифосфата с выходом 89–92%. Длительность реакций на стадиях синтеза не превышает 2–5 мин.

Ключевые слова: дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты, активирующий реагент, трифторуксусный ангидрид, N-метилимидазол.

Дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP) обладают широким спектром биологической активности [2] и находят разнообразное применение в научных исследованиях, в частности, в последнее время, в ПЦР [3]. Для обеспечения таких работ требуются большие количества dNTP высокого качества и по доступной цене. Следовательно, метод их синтеза должен быть эффективным, простым и технологичным. Известные методы синтеза dNTP, несмотря на их разнообразие [4–21], не обеспечивают решения этой задачи. Они основаны, как правило, на получении производных dNMP, активированных по фосфатной группе (кроме метода [18]), обычно фосфамидами, с последующей их реакцией с неорганическим пирофосфатом. Одним из вариантов такого подхода является синтез смешанных ангидридов dNMP и различных кислот, например дифенилфосфорной [10], дибутилтиофосфоновой [14], мезитиленкарбоновой [22] с последующим их использованием в пиридиновом растворе.

Смешанные ангидриды нуклеотидов и карбоновых кислот, стерически менее затрудненных, чем мезитиленкарбоновая, не обладают фосфорилирующей активностью [23]. Для активирова-

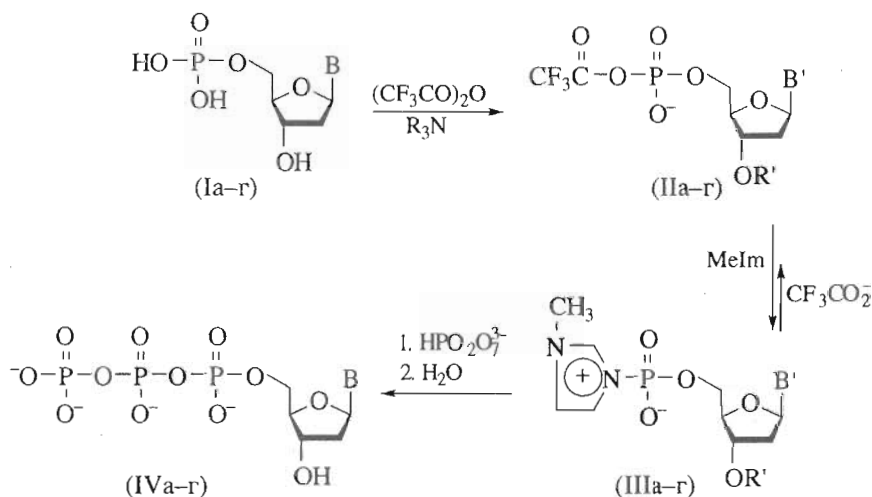
ния фосфатных групп dNMP чаще всего применяют DCC [6–9], 1,1'-карбонилдимидазол [11, 12, 19], арилсульфохлориды [15, 16], смесь трифенилфосфин-дипиридилдисульфид [20, 21, 24]. Из недостатков этих реагентов следует отметить их недостаточно высокую эффективность в реакциях фосфорилирования, труднодоступность и высокую стоимость.

Ранее нами было показано, что TFAA в сочетании с нуклеофильными катализаторами типа MeIm и DMAP является эффективным активирующим реагентом при синтезе различных фосфорированных dTMP, в том числе dTTP [1]. Было найдено, что нуклеофильные катализаторы способны "перекачивать" смешанный ангидрид dTMP и TFA по невыгодному кинетическому пути в термодинамически стабильные MeIm- и DMAP-производные dTMP [1]. Длительность реакции таких фосфамидов с неорганическим пирофосфатом не превышает 5 мин, а выход dTTP составляет 92%. Сравнение по этим параметрам с лучшими известными методами – [9]: 2 сут, 73–84%, [10]: (4 ч, 75–85%), [12, 19]: (4–12 ч, 45–60%), [20, 21]: (40 мин, 40–65%, синтез [³²P]dNTP – показывает перспективность данного подхода. TFAA применяется в пептидной химии для введения N-трифтороацетильных защитных групп [25], а также для активирования карбоновых и других кислот [26]. Это легколетучая жидкость (т. кип. 38°C), стабильная при хранении, легко получается из TFA перегонкой над P₂O₅ [27]. В настоящей работе

* Предыдущее сообщение см. [1].

Сокращения: TFAA – трифторуксусный ангидрид, DMA – N,N-диметилаланин, MeIm – N-метилимидазол, DMAP – 4-N,N-диметиламинопиридин, МКХ – микроколоночная хроматография.

[#] Адрес для переписки: 630017, Новосибирск-17, ул. Б. Богаткова, д. 88, кв. 7, E.mail: dobmi@modul.biochem.nsk.su; тел.: (3832) 35-16-69, факс: (3832) 35-16-65.



- а) В = В' = тимин-1-ил; б) В = цитозин-1-ил, В' = N⁴-трифторацетилцитозин-1-ил; в) В = аденин-9-ил; В' = N⁶-трифторацетиладенин-9-ил; г) В = уанин-9-ил, В' = N²-трифторацетилгуанин-9-ил;
 $\text{R}_3\text{N} = (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}, \text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_2$; $\text{R}' = \text{CF}_3\text{C}(\text{O})-$

Схема.

сообщается о распространении описанной ранее методологии [1] на синтез всех dNTP.

Принципиальные моменты данного подхода, исследованные нами ранее на примере получения dTTP, представлены на схеме.

Процесс синтеза dNTP включает в себя три основные стадии, проводимые в одной колбе: реакцию дезокси-нуклеотидов (Ia–г) с ТФАА в апротонном растворителе в присутствии основания, превращение полученных смешанных ангидридов (IIa–г) в N-метилимидазолиевые производные (IIIa–г) и реакцию последних с неорганическим пиррофосфатом. Деблокирование полученного продукта в результате обработки реакционной смеси водой дает трифосфаты (IVa–г).

Структуру промежуточных соединений (IIa–г) и (IIIa–г) подтверждали данными ³¹P-ЯМР- [1] и УФ-спектроскопии и МКХ (табл. 1 и 2). Для этого их синтезировали по типовой методике (см. “Экспериментальную часть”) с заменой DMA на Et₃N и после удаления летучих продуктов записывали УФ-спектр в СНСl₃. Максимумы полос поглощения соединений (IIб–г) имеют значительный bathochromный сдвиг по сравнению со спектрами исходных (Iб–г) (таблица 1), что характерно для N-ацилированных производных нуклеотидов [28]. Химические свойства интермедиатов (IIa–г) и (IIIa–г) соответствуют их структуре. Обработка метанолом или водным аммиаком приводит к быстрому их деацилированию (табл. 1) и расщеплению

Таблица 1. Характеристика синтезированных соединений*

Соединение	$\frac{\lambda_{\max}, \text{нм}}{\lambda_{\min}, \text{нм}}$ ($\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)		$\frac{A_{250}}{A_{260}}$	$\frac{A_{280}}{A_{260}}$	$\frac{A_{290}}{A_{260}}$	Скорость деблокирования, $\tau_{1/2}$ с		R_f в системах	
	MeOH	0.2 M NH ₄ OH				А	Б		
(IIб)	320 (9.8)	272 (6.2)	–	–	–	30	< 5	–	–
(IIв)	272 (19.5)	302 (5.9)	–	–	–	60	< 5	–	–
(IIг)	310 (8.5)	–	–	–	–	2400	40	–	–
(IVа)	267 (9.6)	235 (2.5)	0.65	0.75	0.27			0.12	0.22
(IVб)	272 (9.1)	248 (5.6)	0.80	1.06	0.43			0.11	0.21
(IVв)	260 (15.4)	228 (3.1)	0.78	0.13	0.04			0.10	0.20
(IVг)	252 (13.7)	224 (3.2)	1.14	0.68	0.29			0.08	0.18

* Спектры соединений (IIб–г) и (IIIа–г) записывали в СНСl₃ и Н₂О соответственно.

ангидридной связи в соединениях (IIa–г) с количественным образованием исходных (Ia–г) (данные МКХ, ТСХ). Гидролиз фосфамидной связи в соединениях (IIIa–г) протекает с существенно меньшей скоростью (время полупревращения $\tau_{1/2}$ 9.6 мин [24]), и они могут быть выделены быстрой ионообменной МКХ (табл. 2, время удерживания 0.8 мин).

Для оптимизации условий синтеза dNTP мы провели исследование основных его стадий, выбрали в качестве критерия оптимизации выход целевого продукта.

Исследования на первой стадии включали в себя варьирование типа растворителя и основания, выбор температурного режима, соотношения и порядка смешения реагентов. Было найдено, что трифторацетилирование dNMP гладко протекает в апротонных растворителях средней полярности, таких, как CH_3CN , DMF, CHCl_3 , в присутствии третичных аминов – Et_3N , DMA, пиридин, 2,4,6-коллидин. Наибольший выход dNTP достигается при использовании комбинации CH_3CN –DMA– Et_3N и мольного соотношения dNMP–TFAA–DMA– Et_3N 1 : 5 : 4 : 1. Ацетонитрил был выбран с учетом как его растворяющих свойств на этой и последующих стадиях, так и технологичности, т.е. легкости очистки, стабильности при хранении, возможности удаления из реакционной смеси. Пиридин и его производные вызывают значительное окрашивание реакционной смеси, поэтому их использование нежелательно. Слабое основание DMA (pK_a 4.8) предпочтительнее Et_3N (pK_a 10.9) для более мягкого протекания реакции ацилирования, но Et_3N необходим для предотвращения апуринизации ангидридов (IIв, г) в случае локального закисления среды при добавлении TFAA. Этой же цели способствует охлаждение реакционной смеси и постепенное, порциями, добавление TFAA, так как реакция его с dNMP экзотермична. Применение избытка TFAA позволяет использовать препараты dNMP (свободные кислоты) с небольшим содержанием влаги без высушивания. При этом не требуется предварительно готовить их растворимые в органических растворителях соли (за исключением dGMP), так как активно протекающая сразу по нескольким центрам (5'-фосфату, 3'-ОН- и NH_2 -группам) реакция ацилирования и наличие в реакционной среде третичных аминов способствуют быстрому растворению нуклеотидов. После завершения процесса активации, т.е. при полном растворении исходных (Ia–г), избыток TFAA удаляется путем кратковременного выдерживания реакционной смеси в вакууме. При необходимости реакцию активации можно провести в гомогенном варианте: к dNMP (свободная кислота) добавляют DMF, триэтил- или трибутил-амин, нагревают до 60–70°C и полученный раствор после охлаждения используют для проведения реакции.

Таблица 2. Кинетические данные реакции 0.2 М метилимидазолида (IIIв) и 0.4 М $\text{HP}_2\text{O}_7(\text{Bu}_3\text{NH})_3$ в CH_3CN при 25°C

Время реакции, с	Состав реакционной смеси, %*			
	(IIIв)	dAMP	dADP	dATP
30	19.5	10.3	0.2	70.0
60	8.6	5.6	0.6	85.2
120	2.9	3.1	1.4	92.6
300	0.2	1.9	1.8	96.7
600	0.2	1.9	2.2	95.7

* По данным МКХ.

Исследования на второй стадии синтеза dNTP заключались в выборе нуклеофильного катализатора из группы MeIm, DMAP, пиридин и определении его оптимального количества в реакции с ангидридами (IIa–г). В результате было установлено, что первые два соединения быстро и количественно (данные ^{31}P -ЯМР-спектроскопии и МКХ) образуют цвиттер-ионные фосфамиды, обладающие высокой реакционной способностью по отношению к аминам [24] и анионам неорганического пирофосфата [1]. В случае пиридина в ^{31}P -ЯМР-спектре реакционной смеси сигнал N-фосфопиридиневого производного dTMP [29] не регистрируется, хотя, вероятно, оно образуется в небольшом (менее 1%) количестве. Последнее подтверждается составом реакционной смеси после обработки ее морфолином: кроме ожидаемого dTMP (δ 2.4 м. д., 55 мол. %) зафиксировано значительное количество морфолида dTMP (δ 5.3 м. д., 15%) и P¹,P²-дитимидин-5'-пирофосфата (δ –10.31 м. д., 30%) (отнесение сигналов в ^{31}P -ЯМР-спектрах – по данным работы [30]).

Таким образом, высокая реакционная способность фосфопиридиневого производного dTMP (по оценке, сделанной на основании работ [24, 29, 31]), она на три-четыре порядка превышает таковую соответствующего DMAP-производного) даже при его низкой концентрации в смеси обеспечивает образование нуклеотидных производных. Но неоднозначность и низкая эффективность такой реакции делает нежелательным применение пиридина в синтезе dNTP.

Полученные результаты позволяют сформулировать общие требования к нуклеофильному катализатору для данного процесса: это должно быть N-содержащее гетероциклическое ароматическое соединение с заместителями, способствующими эффективной делокализации положительного заряда атома азота. По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, добавление 1.5 экв. MeIm и 3 экв. триэтиламина к смешанному ангидриду (IIa) обеспечивает практически полное превращение его в

фосфамид (IIIa). В препаративном синтезе dNTP применяли несколько большее количество MeIm (2–3 экв.) для полного подавления обратной реакции фосфамидов (IIIa–г) с трифторацетат-анионами. Добавление сильного третичного амина на этой стадии необходимо для нейтрализации трифторацетата DMA, способного протонировать MeIm. Для препаративного синтеза dNTP использовали MeIm, а не DMAP, так как последний дает плохо растворимые в CH_3CN производное dGMP и соль неорганического пирофосфата.

На третьей стадии мы исследовали кинетику реакции пирофосфоролиза на примере взаимодействия метилимидазолида (IIIв) с трис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфатом в ацетонитриле (табл. 2). Скорость реакции определяли по суммарному накоплению dATP и продукта его превращения dADP [32]. Было установлено, что реакция в этих условиях протекает очень быстро ($\tau_{1/2} \approx 20$ с) и заканчивается менее чем за 5 мин. Но в реакционной смеси при этом остается до 2% исходного фосфата (Iв), что вызвано, по-видимому, не столько гидролизом фосфамида (IIIв) попавшей в реакционную смесь влагой, сколько равновесным характером реакции активирования, т.е. взаимодействием фосфамидов (IIIa–г) с трифторацетат-анионами, приводящим к образованию ангидридов (IIa–г) и, после разложения последних водой, – dNMP.

Варьирование мольного отношения пирофосфат–фосфамид (IIIв) в диапазоне 1–5 показало, что выход dATP мало зависит от этого параметра. Это было довольно неожиданно, так как обычно в синтезе dNTP применяют 4–6 кратный избыток пирофосфата [9, 12, 15] для подавления побочной реакции образующихся dNTP с фосфамидами, приводящей к образованию P^1, P^4 -динуклеозид-5'-тетрафосфата. Этот эффект, на наш взгляд, обусловлен значительно более высокой по сравнению с dNTP нуклеофильностью анионов пирофосфата, особенно в трионизованной форме, по отношению к фосфамидам (IIIa–г) вследствие существенно меньшего размера и биполярной структуры этого нуклеофила. Тем не менее при уменьшении соотношения пирофосфат–фосфамид (IIIв) ниже 2 в реакционной смеси начинает накапливаться вышеназванный симметричный тетрафосфат (6–8%). Для полного подавления этой реакции мы применяли 2-кратный избыток пирофосфата.

На заключительной стадии реакционную смесь обрабатывали водой для удаления O,N-трифторацетильных групп в полученных dNTP. По данным МКХ, реакция гидролиза заканчивается уже в процессе обработки реакционной смеси, чему способствует присутствие сильных третичных аминов и нуклеофильного катализатора. Исследование кинетики удаления N-трифторацетиль-

ных групп в смешанных ангидридах (IIб–г) в метаноле и 0.2 М растворе NH_4OH в 90% водном метаноле спектрофотометрическим методом подтверждает это (табл. 1). Видно, что этот процесс протекает очень быстро в случае производных (IIб, в) и несколько медленнее в гуаниновом производном (IIг), что характерно для N-ацилированных dNMP [28].

dNTP выделяли при помощи колоночной ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25. Высокое содержание основного продукта в разделяемой смеси позволяет упростить хроматографический процесс – применение широких колонок с крупнозернистым сорбентом позволяет достигать высокой скорости элюции на обычном хроматографическом оборудовании при небольшом давлении. В качестве элюентов использовали растворы солей, легко удаляющихся после хроматографии: LiCl , LiClO_4 , NH_4HCO_3 . Исследования показали, что предпочтительно применение LiCl , так как в этом случае достигается хорошее отделение продукта от примесей dNMP, dNDP и неорганического пирофосфата в слабокислой среде. Такие условия трудно создать при использовании NH_4HCO_3 . Кроме того, в растворах LiCl и LiClO_4 не отмечалось образования dNDP, наблюдаемого при выделении в бикарбонатных растворах. К тому же в отличие от NH_4HCO_3 эти элюенты в отличие от NH_4HCO_3 обеспечивают товарную солевую форму продукта без дополнительных операций. Выделение dNTP в этом случае достигается осаждением их из водно-солевого раствора смесью ацетон–метанол. Недостатками LiClO_4 является снижение емкости DEAE-сефадекса при переходе от Cl^- к ClO_4^- -форме, а также более высокая его стоимость. Полученные таким образом препараты тетралитиевых солей dNTP содержали 98–100% основного вещества, они были охарактеризованы данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР- и УФ-спектроскопии (см. “Экспер. часть”, табл. 1).

Тестирование dNTP в различных ферментативных реакциях, в том числе в ПЦР, показало их высокую биологическую активность, близкую или превышающую таковую фирменных препаратов.

Таким образом, синтез dNTP с применением в качестве активирующего реагента ТФАА в комбинации с нуклеофильными катализаторами типа MeIm отличается высокой эффективностью и скоростью, обеспечивая высокий выход и отличное качество продуктов при сравнительно небольших затратах труда и реактивов. В качестве достоинств ТФАА можно отметить его высокую активность в реакции ацилирования фосфатных, OH- и NH_2 -групп dNMP, легкость удаления из реакционной смеси, отсутствие побочных продуктов в процессе активации, а также доступность и простоту получения. Важным качеством ТФАА

является также возможность его применения в синтезе аналогов dNTP, например содержащих алкиламиноспейсеры в гетероциклическом основании [33]. При этом не требуется специально их защищать, так как это происходит автоматически во время процесса активации. Практический опыт применения TFAA в синтезе dNTP показал, что его можно назвать "reagent of choice" для этого процесса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали dNMP (Омутнинский химзавод), MeIm и DMAP (Merck, Германия), DEAE-сефадекс А-25 (Sigma, США), TFAA (Киевский завод РИАП, а также полученный по [1, 27]).

ТСХ проводили на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254 (Merck, Германия) в системах $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH} - 1 \text{ M NH}_4\text{OAc}$, pH 7.5, 10 : 10 : 1 (А) и изомасляная кислота-конц. NH_4OH -вода, 60 : 2 : 38 (Б).

Обнаружение продуктов на хроматограммах проводили в УФ-свете (хроматоскоп) и реактивом Динше (0.5% цистеин в 3 н H_2SO_4). Значения R_f приведены в табл. 1.

МКХ выполняли на хроматографе "Милихром-4" (ПО "Научприбор", г.Орел), используя колонки (2 × 62 мм) с Полисил СА, 10 мкм (НПО "Вектор", Новосибирск) и ступенчатый градиент 0 → 0.3 М калий-фосфатного буфера (pH 7.5) в 30% метаноле (скорость элюции 200 мкл/мин).

УФ-спектры записывали на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss, Германия) в CHCl_3 и воде;

^1H -ЯМР-спектры – на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия) на частоте 200.13 МГц в D_2O при 300°C с внешним стандартом $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$; ^{31}P -ЯМР-спектры – на спектрометре AC-200 (Bruker, Германия) на частоте 81.015 МГц в D_2O и CH_3CN при 250°C с внешним стандартом 85% H_3PO_4 .

Ацетонитрил перегоняли над P_2O_5 ; CHCl_3 выдерживали над CaCl_2 и перегоняли над P_2O_5 ; DMF – над BaO , H_3BO_3 ; DMA – над CaH_2 в вакууме; Et_3N – последовательно над KOH , ToCl , KOH ; пиридин и 2,4,6-коллиндин – над KOH и P_2O_5 .

Синтез дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (IVa–г). Типовая методика, на примере dCTP. dCMP (свободную кислоту, 3.2 г, 10 ммоль, степень чистоты 96%, 3% воды) суспендировали в смеси ацетонитрила (40 мл), DMA (5.1 мл, 40 ммоль) и триэтиламина (1.4 мл, 10 ммоль), охлаждали до 0–2°C и при перемешивании в течение 3–5 мин добавляли порциями охлажденный до той же температуры раствор TFAA (7 мл, 50 ммоль) в ацетонитриле (10 мл). Суспензию перемешивали 5–10 мин при комнатной температуре до растворения dCMP, выдерживали 5 мин в вакууме водоструй-

ного насоса, охлаждали до 0–2°C и добавляли смесь MeIm (2.4 мл, 30 ммоль) и Et_3N (7 мл, 50 ммоль) в ацетонитриле (10 мл). Раствор выдерживали 1–2 мин, для контроля хода реакции отбирали 10 мкл реакционной смеси, выливали в 10 мкл морфолина и проводили ТСХ в системе А. О завершении реакции активации судили по отсутствию исходного dCMP (R_f 0.28) и образованию его морфолида (R_f 0.66). Далее основную реакционную смесь обрабатывали 1 М $\text{HP}_2\text{O}_7(\text{Bu}_3\text{NH})_3$ (20 мл, 20 ммоль) в ацетонитриле, выдерживали 5 мин, добавляли 200 мл воды и через 5 мин экстрагировали хлороформом амины (3 × 50 мл). Хлороформные экстракты промывали водой (50 мл), объединенные водные слои разбавляли водой до 1 л и наносили на колонку (4.5 × 30 см) с DEAE-сефадексом А-25 (Cl^- -форма, размер частиц 40–120 мкм). Элюцию проводили со скоростью 1 л/ч (насос Региритр 5186, Венгрия) при pH 4.5 последовательно 0.1 М NH_4Cl (1 л), 0.1 М LiCl (1 л) и линейным градиентом 0.1–0.4 М LiCl (5 л; для IVг) – 0.2–0.5 М). Нуклеотидные производные детектировали по поглощению в УФ-свете (Uvicord 2158 SD, Швеция), неорганический пирофосфат – осаждением 0.2 М $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Фракции пиков титровали 1 М LiOH до pH 7.5, измеряли значение A_{272} . Выход продукта на этой стадии 98%. После концентрирования в вакууме до объема 50 мл трифосфат (IVб) осаждали смесью ацетон-метанол (4 : 1, 300 мл), осадок отфильтровывали, промывали той же смесью (3 × 20 мл), высушивали на воздухе (1–2 ч) и затем в вакууме над P_2O_5 (8 ч). Получали 5.02 г (91%) тетралитиевой соли тригидрата dCTP (IVб). УФ-спектральные данные приведены в табл. 1. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 7.74д (1H, $J_{\text{H}_6, \text{H}_5}$ 8 Гц, H6), 6.07т (1H, $J_{\text{H}_1', \text{H}_2' \text{a}} = J_{\text{H}_1', \text{H}_2' \text{b}} = 6.5$ Гц, H1'), 5.91д (1H, $J_{\text{H}_5, \text{H}_6}$ 8 Гц, H5), 4.37м (1H, H3'), 3.97м (3H, H4', H5'a, H5'b), 2.14м (2H, H2'a, H2'b). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м. д.): -4.43д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 18.3 Гц, P $^\alpha$), -10.31д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 18,6 Гц, P $^\alpha$), -19.68 т (1P, P $^\beta$).

Тимидин-5'-трифосфат (IVa) получен как описано в работе [1]. При синтезе dTTP по приведенной выше типовой методике из dTMP (Ia) (3.4 г, 10 ммоль, степень чистоты 95%, 3% воды) с использованием уменьшенных загрузок DMA (3.9 мл, 30 ммоль) и TFAA (5.6 мл, 40 ммоль) выход продукта после ионообменной хроматографии – 98%. После осаждения смесью ацетон-метанол выход тетралитиевой соли тригидрата (IVa) 5.21 г (92%). УФ-спектральные данные приведены в табл. 1. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 7.51с (1H, H6), 6.11т (1H, $J_{\text{H}_1', \text{H}_2' \text{a}} = J_{\text{H}_1', \text{H}_2' \text{b}} = 6.5$ Гц, H1'), 4.44 м (1H, H3'), 3.70м (3H, H4', H5'a, H5'b), 2.15м (2H, H2'a, H2'b), 1.69с (3H, 5CH₃). ^{31}P -ЯМР-спектр

(δ , м. д.): -6.34д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 18.9 Гц, P $^\gamma$), -10.81д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 19,3 Гц, P $^\alpha$), -21.29т (1P, P $^\beta$).

Дезоксиаденозин-5'-трифосфат (IVв). Синтез проводили по типовой методике из dAMP (Iв) (свободная кислота, 3.52 г, 10 ммоль, степень чистоты 94%, 4% воды). Выход продукта после ионообменной хроматографии 95% после осаждения 5.08 г (89%) в виде тригидрата тетралитиевой соли dATP. УФ-спектральные характеристики приведены в табл. 1. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 8.15с (1H, H8), 7.82с (1H, H2), 6.15т (1H, $J_{\text{H}1', \text{H}2'a} = J_{\text{H}1', \text{H}2'b} = 6.5$ Гц, H1'), 4.52 м (1H, H3'), 4.01м (3H, H4', H5'a, H5'b), 2.52м (2H, H2'a, H2'b). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м. д.): -5.81д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 19.1 Гц, P $^\gamma$), -10.49д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 18,7 Гц, P $^\alpha$), -20.92т (1P, P $^\beta$).

Дезоксигуанозин-5'-трифосфат (IVг). dGMP (диаммониевая соль, 4.1 г, 10 ммоль, степень чистоты 98%, моногидрат) переводили в ди(Et_3N)-соль двукратным упариванием с 70 мл смеси метанол-вода-триэтиламин (3 : 3 : 1) в вакууме. Остаток высушивали 2 ч в вакууме над P_2O_5 при 45–50°C и использовали для синтеза dGTP по типовой методике, описанной выше. Выход dGTP после хроматографии составил 96%, после осаждения – 5.25 г (90%) тригидрата тетралитиевой соли. УФ-спектральные характеристики приведены в табл. 1. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 7.86с (1H, H8), 6.05т (1H, $J_{\text{H}1', \text{H}2'a} = J_{\text{H}1', \text{H}2'b} = 7.0$ Гц, H1'), 4.52м (1H, H3'), 3.98м (3H, H4', H5'a, H5'b), 2.30м (2H, H2'a, H2'b). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м. д.): -7.07д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 19.7 Гц, P $^\gamma$), -10.63д (1P, $J_{\text{P}^\alpha, \text{P}^\beta}$ 19.0 Гц, P $^\alpha$), -21.52т (1P, P $^\beta$).

Реакция метилимидазолида (IIIв) с неорганическим пирофосфатом. Синтез dATP (IVв) проводили по типовой методике, приведенной выше, из 0.035 г, (0.1 ммоль) дезоксинуклеотида dAMP (Iв), заменяя DMA на Et_3N (0.7 мл). После добавления неорганического пирофосфата отбирали пробы реакционной смеси (10 мкл), выливали их в смесь воды (100 мкл) и хлороформа (100 мкл), предварительно охлажденную до 0–2°C, встряхивали и замораживали до -18°C . Далее пробы анализировали при помощи ионообменной МКХ. Данные приведены в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачев В.С. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 212–217.
2. Корнберг А. Синтез ДНК: Пер. с англ. М.: Мир, 1977 (Kornberg A. Enzymatic Synthesis of DNA. N. Y.: John Wiley & Sons. 1974).
3. Mullis K.B., Faloona F.A. // Methods Enzymol. 1987. V. 155. P. 335–350.
4. Michelson A.M., Todd A.R. // J. Chem. Soc. 1949. P. 2487–2490.
5. Kenner G., Todd A.R., Webb R.F., Weymouth F.J. // J. Chem. Soc. 1954. P. 2288–2294.
6. Khorana H.G. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 3517–3522.
7. Smith M., Khorana H.G. // J. Am. Chem. Soc. 1958. V. 80. P. 1141–1145.
8. Moffatt J.G., Khorana H.G. // J. Am. Chem. Soc. 1961. V. 83. P. 649–658.
9. Moffatt J.G. // Can. J. Chem. 1964. V. 42. P. 599–604.
10. Michelson A.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1964. V. 91. P. 1–13.
11. Cramer F., Schaller H., Staab H.A. // Ber. 1961. B. 94. S. 1612–1621.
12. Hoard D.E., Ott D.G. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 1785–1788.
13. Symons R.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 209. P. 296–305.
14. Hata T., Furusawa K., Sekine M. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1975. P. 196–197.
15. Загребельный С.Н., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Позднякович С.А., Ярмолинская Е.В., Вершинина С.И., Рыбак В.К. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1978. Вып. 1. С. 136–142.
16. Загребельный С.Н., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Лубенец Э.Г., Хмельницкий А.Г., Яснецкая С.М. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1978. Вып. 2. С. 143–147.
17. Hartog J.A.J., den, Boom J.H., van // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1981. V. 100. P. 285–290.
18. Dixit Y.M., Poulter C.D. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. P. 4055–4058.
19. Зайцева В.Е., Дяткина Н.В., Краевский А.А., Туррина О.В., Готтих В.П., Ажаев А.В. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. С. 670–680.
20. Гришаев М.П., Рукавишников М.Ю., Самуков В.В., Аммосов А.Д., Портнянко А.П., Сидоров В.Н. // I Всесоюз. совещ. "Биологически-активные соединения, меченные радиоактивными изотопами": Тез. докл. М., 1985. С. 56.
21. Гришаев М.П. Химический синтез [α - ^{32}P]- и [γ - ^{32}P]нуклеозид трифосфатов. Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск: Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии, 1989. С. 105.
22. Shumyantseva V.V., Sokolova N.I., Shabarova Z.A. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. P. 903–916.
23. Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 111–197.
24. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
25. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987.
26. Tedder J.M. // Chem. Rev. 1955. V. 55. P. 787–827.
27. Кошелева Г.Н. Методы получения химических реактивов. М.: ИРЕА, 1966. С. 46–49.
28. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H.G. // J. Am. Chem. Soc. 1963. V. 85. P. 3821–3827.

29. Зарьтова В.Ф. // Итоги науки и техники. Сер. "Биоорганическая химия". М.: ВИНТИ, 1984. Т. 4. С. 68.
30. Лебедев А.В., Резвухин А.И. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 149–185.
31. Jameson G.W., Lawor J.M. // J. Chem. Soc. (B). 1970. P. 53–57.
32. Verheyden D.L.M., Wehrly W.E., Moffatt J.G. // J. Am. Chem. Soc. 1959. V. 81. P. 4660–4664.
33. Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // Bioconj. Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.

Synthesis of Deoxynucleoside 5'-Triphosphates Using Trifluoroacetic Anhydride as an Activating Reagent

V. S. Bogachev

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract—A new general method was developed for the synthesis of deoxynucleoside triphosphates. Deoxynucleoside monophosphates reacted with trifluoroacetic anhydride in an aprotic solvent in the presence of tertiary amines to give mixed anhydrides of deoxynucleoside monophosphates and trifluoroacetic acid, which were subsequently treated with a nucleophilic catalyst (*N*-methylimidazole or 4-dimethylaminopyridine) and inorganic pyrophosphate. The reaction conditions were optimized, and all four possible nucleoside triphosphates were obtained in 89–92% yields. The reaction times do not exceed 2 to 5 min at any synthetic step.

Key words: deoxynucleoside 5'-triphosphates; activating reagent; trifluoroacetic anhydride; *N*-methylimidazole.