



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

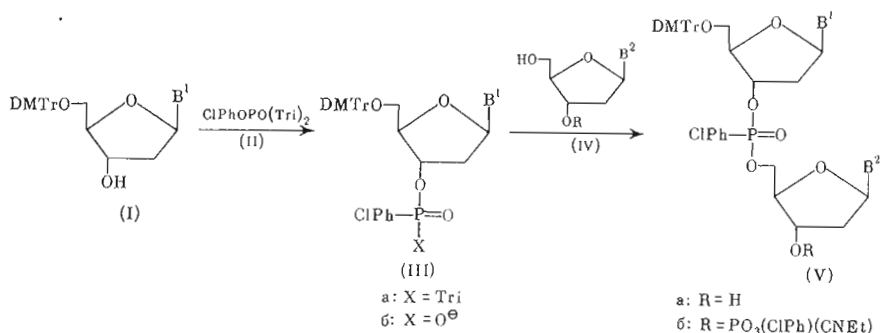
УДК 547.963.32.07+542.953.2

### НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ РЕАКЦИЙ ФОСФОРИЛОВАНИЯ ФОСФОТРИАЗОЛИДАМИ В ТРИЭФИРНОМ СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Добрынин В. И., Быстров Н. С., Чернов Б. К.,  
Северцова И. В., Колосов М. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Реакции О-фосфорилирования обычно проводят в присутствии третичных азотистых оснований, которые связывают протон, выделяющийся из фосфорилируемого гидроксила. При синтезе олигонуклеотидов в качестве таких оснований часто применяются пиридин и триэтиламин, реже 1-метилимидазол. Очевидно, что во многих случаях используемые основания не только выполняют роль акцепторов протона, но и непосредственно участвуют в реакции фосфорилирования. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что пиридин существенно ускоряет реакцию нуклеозидов (I) с фосфодитриазолидом (II) [1], при которой не нужны внешние акцепторы протона, так как последний связывается уходящей от фосфора триазольной группой.



B — основание, DMTr — диметокситриил, Tri — сим-триазол-1-ил, ClPh — *n*-хлорфенил, CNEt — цианэтил

Поэтому с целью изыскания эффективного катализатора для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов мы провели сравнительную оценку влияния названных выше оснований на скорость превращения (I) + (II) → (IIIa) при B<sup>1</sup> = Thy. Реакцию проводили при комнатной температуре в диоксановом растворе, содержащем 0,2 М нуклеозид, 0,4 М исследуемое

основание и 0,24 М *n*-хлорфенилфосфодитриазолидат (приготовленный из соответствующего фосфодихлорида и 2 моль триазола в присутствии 2 моль триэтиламина), следя за исчезновением исходного (I) по ТСХ на силуфоле. Было найдено, что триэтиламин ( $pK_a$  10,7) не оказывает заметного ускоряющего действия и реакция с ним, так же как в его отсутствие, не доходит полностью до конца даже за 6 ч; пиридин ( $pK_a$  5,2) сокращает время фосфорилирования до 3 ч, а в присутствии 1-метилимидазола ( $pK_a$  7,3) реакция заканчивается за 20—30 мин.

Отсутствие прямой корреляции между активностью катализатора и величиной его  $pK_a$  показало, что наблюдаемый эффект не является следствием общего основного катализа, а зависит, вероятно, от нуклеофильности катализатора по отношению к Р-атому фосфорильной группы. Предполагая, что у гетероароматических оснований эта нуклеофильность должна быть тем больше, чем выше электронная плотность на иминном азоте и чем меньше он экранирован  $\alpha$ -заместителями, мы решили испытать в качестве катализатора фосфорилирования 4-диметиламинопиридин ( $pK_a$  9,7), который известен как высокоактивный катализатор реакций ацилирования (см. обзор [2]). Действительно, оказалось, что это соединение в большей мере, чем пиридин или метилимидазол, ускоряет реакцию (I) с (II), обеспечивая ее завершение за 15—20 мин.

Относительно следующей стадии фосфотриэфирного синтеза (IIIa) + (IVa)  $\rightarrow$  (Va) в литературе имелось сообщение [3], что сама по себе эта конденсация не идет, но может быть успешно осуществлена после прибавления эквимольной смеси бензолсульфокислоты и триэтиламина в пиридине и концентрирования реакционного раствора. Мы исследовали эту конденсацию на примере соединений (IIIa) и (IVa) с  $V^1=V^2=Thy$ , контролируя ее течение с помощью  $^{31}P$ -ЯМР по уменьшению интенсивности сигналов фосфотриазолида (IIIa) (два Р\*-диастереомера с  $\delta_p$  15,45 и 15,54 м.д.) и нарастанию сигналов фосфотриэфира (V) (Р\*-диастереомеры с  $\delta_p$  13,58 и 13,95 м.д.). Ни с заранее приготовленной солью  $PhSO_3^- \cdot Et_3NH^+$ , ни с любым из ее компонентов,  $PhSO_3H$  или  $Et_3N$ , мы не обнаружили каталитического эффекта: реакция протекала с приблизительно такой же скоростью, как просто в пиридиновом растворе, где она заканчивалась за 3—4 ч, приводя к  $(DMTr)_3Tr(ClPh) \cdot Tr$  с выходом около 60%. В отличие от этих результатов при проведении реакции в присутствии 0,1 М 4-диметиламинопиридина фосфорилирование завершилось за 30 мин и после хроматографической очистки выход защищенной тимидиновой «двойки» (Va) составлял 85—90%.

Ранее нами было показано, что моноэфиры нуклеотидов (IIIб) при «активации» арилсульфотриазолидами превращаются в тетразамещенные пирофосфаты и фосфотриазолидаты (IIIа), которые являются реакционно-способными промежуточными соединениями в межнуклеотидной конденсации [1]. Поскольку 4-диметиламинопиридин эффективно катализировал реакции фосфорилирования триазолидатами (IIIа), мы проверили также возможность его использования в триэфирном синтезе олигонуклеотидов с арилсульфотриазолидами в качестве конденсирующих реагентов. На примере 5'-фосфорилирования 3'-тимидинового фосфотриэфира (IVб,  $V^2=Thy$ ) 3'-цитидилатом (IIIб,  $V^1=bzCyt$ ) под действием 2,4,6-триизопропилбензолсульфотриазолида (наименее активного из арилсульфотриазолидов) было установлено, что 4-диметиламинопиридин в концентрации 0,5 М вызывает заметное ускорение реакции и увеличивает выход продукта конденсации (с 33 до 46%).

Таким образом, гетероциклические основания типа пиридина и 1-метилимидазола эффективно катализируют реакции фосфорилирования оксисоединений фосфотриазолидами, причем особенно высокую активность проявляет 4-диметиламинопиридин, который по этой причине является перспективным катализатором для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов в растворе и на полимерных носителях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 523–534.
2. Höfle G., Steglich W., Vorbrüggen H. (1978) *Angew. Chem.*, **90**, 602–615.
3. Agarwal K. L., Riffina F. (1978) *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2809–2822.

Поступило в редакцию  
2.IV.1979

### NUCLEOPHILIC CATALYSIS OF PHOSPHOTRIAZOLIDE — EFFECTED PHOSPHORYLATION IN THE TRIESTER SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES

DOBRYNIN V. N., BYSTROV N. S., CHERNOV B. K.,  
SEVERTSOVA I. V., KOLOSOV M. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Catalytic activity of tertiary bases in phosphotriazolidine - effected phosphorylation reactions of deoxynucleosides was studied. Among the bases commonly used in oligonucleotide synthesis, pyridine and especially 1-methylimidazole strongly promoted the phosphorylations, however, in disagreement with the communication by Agarwal, neither triethylammonium benzenesulphonate, nor triethylamine itself enhanced the reactions. The highest catalytic activity was manifested by 4-dimethylaminopyridine which considerably accelerated 3'-phosphorylation with chlorophenyl phosphoditriazolidate and the 5'-phosphorylation (i. e. the internucleotide condensation) with chlorophenyl deoxynucleoside-3'-phosphotriazolidate, as well as phosphotriester formation on couplings effected by arenesulphonyltriazolidines. Thus, dimethylaminopyridine appeared to be a promising catalyst for a rapid synthesis of oligonucleotides by the phosphotriester approach in solution or on polymer supports.