



УДК 577.113.6 : 547.963.32.057 : 542(953+973)

ПРИМЕНЕНИЕ КИСЛОРОДНУКЛЕОФИЛЬНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ БЫСТРОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ

Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г.

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

Проведено дальнейшее усовершенствование фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов, позволявшее в несколько раз увеличить скорость синтеза в растворе и на полимерных носителях. Разработанная методология основана на использовании в качестве конденсирующих реагентов для создания межнуклеотидной связи арилсульфонилхлоридов и их производных в присутствии кислороднуклеофильных катализаторов — 4-замещенных производных N-оксидов пиридина и хинолина. Показаны преимущества применения O-нуклеофильных катализаторов в отношении уменьшения количества побочных процессов. Эффективность быстрого фосфотриэфирного метода продемонстрирована на примере успешного синтеза ряда олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 20 мононуклеотидных звеньев.

В последние годы доступность синтетических фрагментов нуклеиновых кислот играет все возрастающую роль при проведении целого ряда молекулярно-биологических исследований, в особенности работ в области рекомбинантных ДНК. Наличие синтетических олиго- и полинуклеотидов предоставляет исследователю практически неограниченные возможности для создания новых искусственных генетических структур, для направленного мутагенеза природных генов и проведения экспериментов по белковой инженерии. Оно способствует также дальнейшему изучению структуры и функции нуклеиновых кислот и белков.

В современном олигонуклеотидном синтезе наибольшее распространение получил триэфирный подход, в частности его фосфатная и фосфитная разновидности [1]. Обе эти методологии разработаны в настоящее время настолько, что позволяют в достаточно сжатые сроки получать олигомеры длиной в 15—20 мономерных звеньев, которые наиболее часто используются в молекулярно-биологических исследованиях, а также более длинные одноцепочечные молекулы. Однако, несмотря на достигнутые успехи, как фосфитный, так и фосфатный методы продолжают постоянно совершенствоваться в направлении увеличения скорости и упрощения процедуры синтеза и очистки олигонуклеотидов.

Ранее нами был разработан ускоренный вариант фосфотриэфирного подхода, основанный на использовании для создания межнуклеотидной связи арилсульфонилхлоридов в присутствии эффективного нуклеофильного катализатора — 1-метилмидазола (I) [2]*. Позже было показано, что наряду с арилсульфонилхлоридами в сочетании с 1-метилмидазолом могут также использоваться арилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолы [3]. Применение 1-метилмидазола в фосфотриэфирном методе сделало возможным проведение межнуклеотидных конденсаций не только в пиридине, который является традиционным растворителем для олигонуклео-

Приятые сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил, MSCl — мезитилсульфонилхлорид, MSNT — мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазол, TPSCl — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, BT — бензотриазол, NC — нуклеофильный катализатор. Префикс «d» (дезоксид) для краткости опущен.

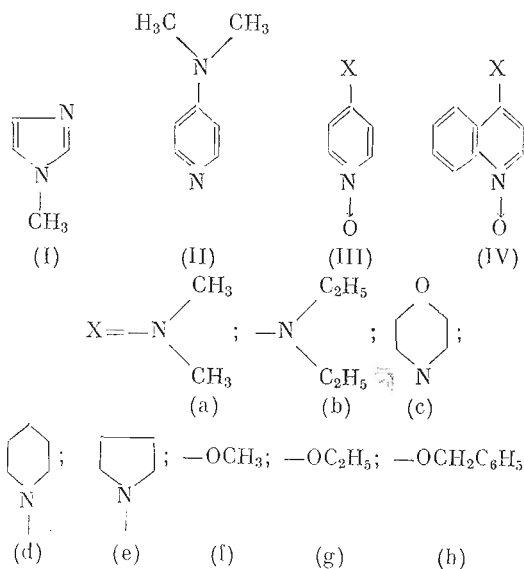
* В то же время было показано, что 4-диметиламинопиридин (II) также является эффективным нуклеофильным катализатором в этих реакциях. Однако большое количество побочных продуктов, образующихся при его применении, не дало возможности использовать его в синтезе достаточно длинных олигонуклеотидов [2, 4].

тидного синтеза, но и в целом ряде других органических растворителей, таких, как ацетонитрил, нитрометан, хлористый метилен, дихлорэтан, хлороформ, диоксан и др. Разработанный метод исключал также использование производных триазола и тетразола в качестве фосфорилирующих реагентов при приготовлении соответствующим образом защищенных мононуклеотидов [4].

Эффективность метилимидазольного метода в растворе и на полимерных носителях была доказана успешным синтезом большого числа олигодезоксирибонуклеотидов в различных лабораториях [3, 5–7]. Применение этого метода в твердофазном варианте олигонуклеотидного синтеза позволяет за несколько часов синтезировать 16–20-звенные олигонуклеотиды исходя из моно- и динуклеотидов. При этом продолжительность одного цикла наращивания составляет ~25–30 мин.

В продолжение исследований по усовершенствованию фосфотриэфирного метода синтеза нами был предпринят поиск более мощных, чем 1-метилимидазол, нуклеофильных катализаторов, которые позволили бы еще более увеличить скорость создания фосфотриэфирной связи и уменьшить количество побочных продуктов, связанных с модификацией гетероциклических оснований, которые затрудняют очистку целевых продуктов.

Недавно в литературе появилось сообщение, что N-окиси пиридинов являются в 50–100 раз более эффективными катализаторами в реакциях амнолиза производных карбоновых и арилсульфоновых кислот, чем соответствующие им пиридиновые основания [8]. Как показали проведенные нами эксперименты (см. ниже), применение аналогичных кислороднуклеофильных катализаторов на основе 4-замещенных производных N-окиси пиридина (III) и хинолина (IV) в реакциях образования фосфотриэфирной связи приводит к значительному ускорению также и этих реакций. Межнуклеотидные конденсации в растворе под действием таких реагентов, как арилсульфонилхлориды или арилсульфонилнитротриазолиды, в присутствии соединений типа (III) заканчиваются примерно за 1 мин, что в несколько раз быстрее, чем с (I) или (II).



Сравнительный анализ скорости реакции межнуклеотидной конденсации в присутствии 1-метилимидазола и катализаторов типа (III) и (IV) проводили на примере получения тринуклеотида $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_n\text{anCp}(\text{ClPh})\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Bz})$ из мономера $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_n\text{anCp}(\text{ClPh})$ или его 3'-P-бензотриазолида [9] (P-компонент) и динуклеотидмонофосфата $\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Bz})$. В реакцию вводили 1,3-кратный избыток P-компонента относительно OH-компонента, а также 2-кратный избыток конденсирующего реагента и 4-кратный избыток нуклеофильного катализатора относитель-

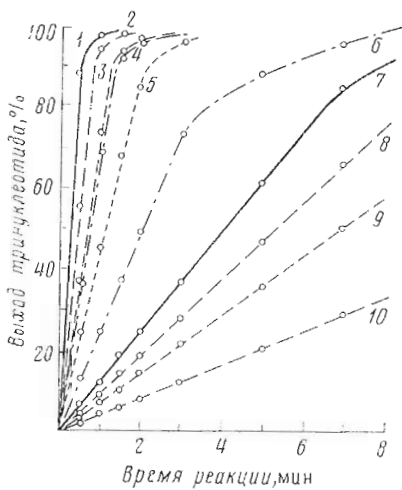


Рис. 1

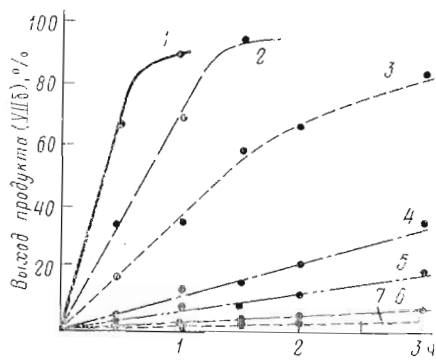


Рис. 3

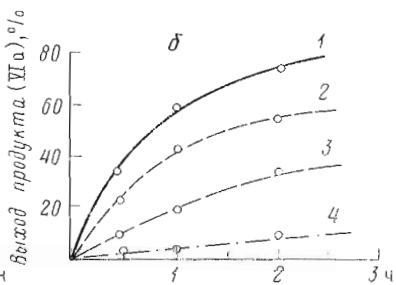
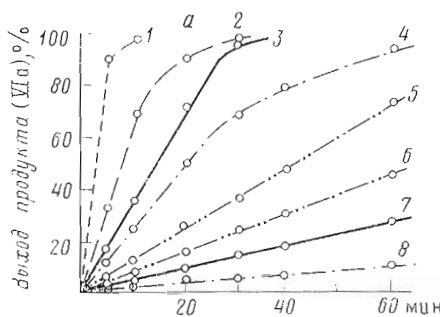


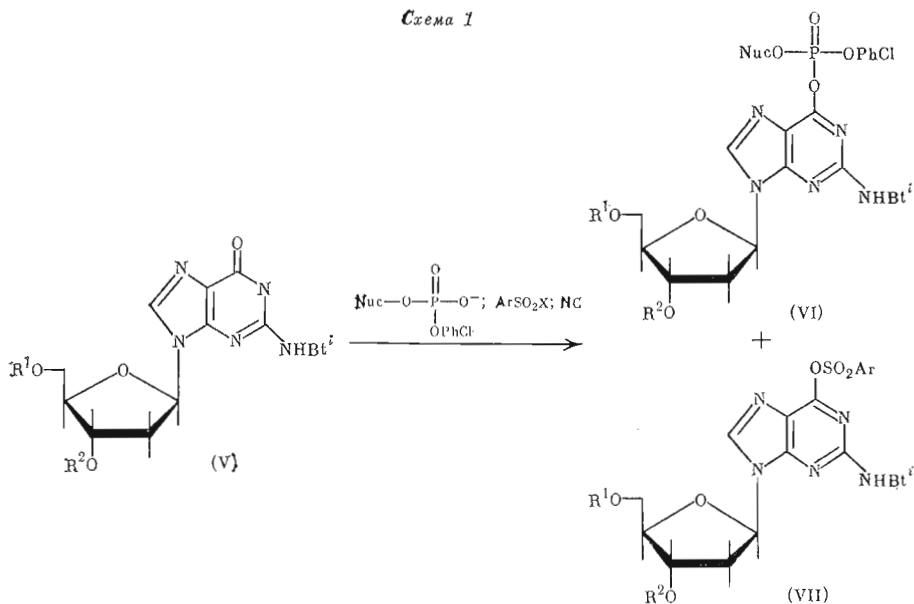
Рис. 2

Рис. 1. Скорости конденсации $\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Bz})$ с $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{\text{an}}\text{Cr}(\text{ClPh})$ или его 3'-Р-бензтриазолидом (4, 6) в CH_2Cl_2 или пиридине (10) с использованием различных конденсирующих реагентов и NC: 1 - $\text{MScI}+(\text{IIIa})$, 2 - $\text{MSNT}+(\text{IIIa})$, 3 - $\text{TPSCl}+(\text{IIIa})$, 4 - (IIIa), 5 - $\text{TPSCl}+(\text{IVa})$, 6 - (I), 7 - $\text{MScI}+(\text{I})$, 8 - $\text{MSNT}+(\text{I})$, 9 - $\text{TPSCl}+(\text{I})$, 10 - MSNT . Концентрации реагентов и условия проведения реакций приведены в «Экспер. части»

Рис. 2. 0⁶-Фосфорилирование 0,05 M $(\text{Ac})\text{ibG}(\text{Ac})$ (Va) при действии 0,1 M $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{\text{an}}\text{Cr}(\text{ClPh})$ (a) или 0,1 M бензтриазолида $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{\text{an}}\text{Cr}(\text{ClPh})$ (BT) в присутствии различных конденсирующих агентов (0,2 M) и NC - a) в CH_2Cl_2 или пиридине (3, 5), [NC] 0,4 M: 1 - $\text{TPSCl}+(\text{II})$, 2 - $\text{TPSCl}+(\text{I})+0,6$ M Et_3N , 3 - $\text{TPSCl}+(\text{I})$, 4 - $\text{TPSCl}+(\text{I})$, 5 - $\text{MSNT}+(\text{I})$, 6 - $\text{MSNT}+(\text{I})$, 7 - $\text{MSNT}+(\text{IIIa})$, 8 - $\text{TPSCl}+(\text{IIIa})$; б) в CH_2Cl_2 , [NC] 0,3 M: 1 - (II), 2 - (I)+ Et_3N , 3 - (I), 4 - (IIIa)

Рис. 3. 0⁶-Сульфонилирование $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_{\text{ib}}\text{G}(\text{Ac})$ (Vб) в CH_2Cl_2 под действием 0,2 M конденсирующего реагента в присутствии 0,4 M NC: 1 - $\text{TPSCl}+(\text{II})$, 2 - $\text{TPSCl}+(\text{I})+\text{Et}_3\text{N}$, 3 - $\text{MSNT}+(\text{I})+\text{Et}_3\text{N}$, 4 - $\text{TPSCl}+(\text{I})$, 5 - $\text{MSNT}+(\text{I})$, 6 - $\text{MScI}+(\text{IIIa})$, 7 - $\text{TPSCl}+(\text{IIIa})$

но Р-компонента. В качестве растворителя использовали дихлорметан. Наибольшая скорость реакции наблюдалась при применении в качестве конденсирующего реагента смеси катализатора (IIIa) с мезитилсульфохлоридом, несколько меньшая — при использовании смеси того же катализатора с тривизопропилбензолсульфохлоридом (рис. 1). Однако и в последнем случае реакция завершилась менее чем за 2 мин. В тех же условиях межнуклеотидная конденсация в присутствии метилимидазола в зависимости от характера арилсульфонилхлорида завершалась за 10—15 мин. Подобно этому замена 1-метилимидазола на О-нуклеофильные катализаторы при образовании фосфотриэфирной связи через бензтриазольные производные нуклеотидов также в 3 раза повышает скорость синтеза (рис. 1, 4, 6).



а: R¹=R²=Ac, б: R¹=Ac, R²=(MeO)₂Tr; Btⁱ – изобутирил, Nuc – блокированный остаток нуклеозида, X=Cl или 3-нитро-1,2,4-триаголи

Сравнение относительной мощности О-нуклеофильных катализаторов (III), (IV) показало, что скорость реакции конденсации мало зависит от структуры заместителя «X» в 4-м положении N-окиси пиридина, хотя скорость реакции в присутствии алкоксипроизводных (f-h) в некоторых растворителях все же несколько выше. В то же время конденсации в присутствии производных хинолина (IV) проходят в несколько раз медленнее. Следует отметить, что, несмотря на свою относительно низкую основность (рK_a~2-4) (для катализаторов (I), (II) рK_a=7,3 и 9,61 соответственно), N-окиси (III) и (IV) способны обеспечить помимо нуклеофильного катализа связывание кислот, выделяющихся в процессе образования фосфотриэфирной связи. Поэтому так же, как и в случае 1-метилмидазола, проведение межнуклеотидных конденсаций в их присутствии может быть осуществлено не только в пиридине, но и в целом ряде органических растворителей. Однако следует учитывать, что растворимость соединений (III) и (IV) в этих растворителях различна. Например, N-окись 4-морфолинопиридина (IIIc) хорошо растворима как в хлорированных углеводородах, так и в пиридине. В то же время N-окись 4-диметиламинопиридина (IIIa) хорошо растворяется в хлористом метиле, но плохо в пиридине.

Одним из побочных процессов в синтезе олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом является модификация гетероциклических оснований [10]. Хотя эти реакции обычно протекают необратимо всего на несколько процентов за время одной межнуклеотидной конденсации, в течение синтеза всего олигонуклеотида от стадии к стадии побочные соединения накапливаются и в конечном счете сильно затрудняют выделение целевого соединения. В особенности это проявляется при проведении полимерного синтеза, где используются большие избытки Р-компонента и конденсирующего реагента при большей продолжительности всех реакций.

Изучение степени модификации гетероциклических оснований проводили на примере 3',5'-О- и N²-защищенного дезоксигуанозина. Исследовались реакции О⁶-фосфорилирования и О⁶-сульфонилирования, протекающие при действии активированного Р-компонента межнуклеотидной конденсации в присутствии избытка конденсирующего реагента [10-12] (схема 1). При изучении реакции фосфорилирования гетероциклического кольца 3',5'-ди-О-ацетил-N²-изобутирилдезоксигуанозина (Va) 0,1 М рас-

говором активированного мономерного Р-компонента [(MeO)₂Tr]anCr(ClPh) в присутствии 0,4 М растворов 1-метилимидазола (I), 4-диметиламинопиридина (II) и N-окиси 4-диметиламинопиридина (IIIa) установили, что наибольшая скорость этой реакции наблюдалась при использовании в качестве конденсирующего реагента смеси арилсульфонилхлорида с катализатором (II) (рис. 2a). Уже через 10 мин проходило практически количественное фосфорилирование гетероцикла. Под действием того же арилсульфонилхлорида в сочетании с 1-метилимидазолом для завершения этой реакции требовалось более 60 мин, а в сочетании с N-окисью (IIIa) за то же время O⁶-фосфорилирование остатка гуанина проходило только на 10%. Наименьшая степень протекания этой реакции наблюдалась при взаимодействии нуклеозида (Va) с бензтриазолидом Р-компонента в присутствии соединения (IIIa). В этом случае O⁶-фосфорилированный продукт (VI) можно было получить с выходом 10% только при выдержке свыше 3 ч (рис. 2б).

O⁶-Сульфонилирование изучали на 3'-O-ацетил-5'-O-диметокситритил-N²-изобутиридиндезоксигуанозине (Vб). Использовали 0,2 М раствор арилсульфонилхлорида или -нитротриазолида в хлористом метиле (рис. 3). Здесь наблюдалась та же тенденция: наибольшая скорость сульфонилирования была в присутствии соединения (II) (90% менее чем за 1 ч), наименьшая — с O-нуклеофильным катализатором (IIIa) (<1% за 1 ч).

Полученные результаты показывают также, что степень прохождения побочных реакций модификации гетероциклов нуклеозидов сильно зависит от основности среды, а следовательно, и от основных свойств нуклеофильного катализатора. Это подтверждается экспериментами, в которых в реакционную среду наряду с нуклеофильным катализатором и конденсирующим реагентом прибавлялся триэтиламин. Как можно видеть из рис. 2 и 3, скорость побочных реакций фосфорилирования и сульфонилирования гетероцикла при этом возрастала примерно в 2—3 раза. При проведении реакций в пиридине количество побочных продуктов также несколько увеличивалось. Поскольку N-окиси пиридинов являются значительно более слабыми основаниями, чем соответствующие им пиридины

Таблица 1

Синтетические олигонуклеотиды, полученные с помощью O-нуклеофильных катализаторов

Длина цепи	Структура	Носитель *	Цель синтеза	Выход, % **	
				до удаления с носителя	после удаления с носителя, деблокирования и очистки
16	CGTGTAGTAGTCAATC	БД	Молекулярный зонд для идентификации гена бычьего родоспина	55	18
17	TATTTTTTGCAGGGGGG	ПС	Фрагмент промоторной области λP _L	34	10
20	ATCTGCCGGTGATAAATTATC	НС	То же	45	12,5
20	AACATCAGCCTTTGTCAATC	БД	Олигонуклеотид-мутagen для направленной модификации гена препронсулина человека	40	15
15	GATCCATGGTGGTCA	БД	Фрагмент промоторной области λP _L	59	20
13	AATTCCCCCTGC	СИ	То же	63	21

* БД — бумажные диски, ПС — пористое стекло, СИ — силикагель.

** В расчете на первый нуклеозид, присоединенный к носителю.

($\Delta pK_a \approx 4-6$), они, видимо, в минимальной степени способствуют прохождению подобных побочных реакций.

Другая побочная реакция, наблюдаемая обычно при использовании производных арилсульфоокислот в качестве конденсирующих реагентов для олигонуклеотидного синтеза, заключается в сульфонилировании 5'-гидроксила нуклеозидного компонента. Сравнение скоростей сульфонилирования под действием арилсульфохлоридов в присутствии 1-метилимидазола и N-оксидов (III) и (IV) показало, что в случае N-оксидов реакция протекает быстрее. Однако в условиях нормальной межнуклеотидной конденсации количество сульфонилированного продукта в присутствии (III) или (IV) практически такое же, как и с метилимидазолом. Так, за время прохождения конденсации (обычно 10—15 мин) с применением метилимидазола и мезитиленсульфохлорида образуется ~1% 5'-сульфонилированного продукта, а в присутствии мезитиленсульфохлорида и (IIIa) то же количество побочного продукта (~1%) образуется в течение 1 мин, необходимой для завершения межнуклеотидной конденсации с этим нуклеофильным катализатором.

В настоящее время наиболее быстрым и наименее трудоемким способом получения олигонуклеотидов является полимерный синтез. С помощью O-нуклеофильных катализаторов нами был получен на полимерных носителях целый ряд олигомеров с длиной цепи от 13 до 20 мономерных звеньев (некоторые из них приведены в табл. 1). Олигонуклеотидные блоки для наращивания цепи, несущие 3'-концевую фосфодиэфирную группировку, и защищенные мононуклеотиды синтезировали, как описано ранее [4]. Полинуклеотидную цепь удлиняли от 3'- к 5'-концу последовательным прибавлением предварительно приготовленных P-компонентов реакции к закрепленному на смоле нуклеозиду, имеющему свободный 5'-гидроксил (схема 2). Синтез проводили на полимерах ненабухающего типа на основе стекла и силикагеля, а также на дисках из бумаги Ватман 3ММ [7]. Первый нуклеозид присоединяли к носителю в соответствии с процедурой, описанной нами ранее [6]. На каждой стадии использовали 5—10-кратный избыток P-компонента относительно присоединенного к смоле ОН-компонента. Реакции конденсации осуществляли в присутствии 2-кратного избытка арилсульфонилхлорида и 4-кратного избытка нуклеофильного катализатора относительно P-компонента. Условия проведения реакций и типичные циклы обработки полимеров приведены в табл. 2.

Применение O-нуклеофильных катализаторов (III) в полимерном олигонуклеотидном синтезе позволило сократить время, требующееся для проведения одного цикла наращивания цепи, до 10 мин. При этом реакции межнуклеотидных конденсаций с 0,1 М растворами P-компонента заканчиваются за 2—5 мин и проходят с практически количественным

Таблица 2

Последовательность операций в одном цикле наращивания при синтезе олигонуклеотидов на полимерных носителях

Номер стадии	Название	Реагенты и растворители *	Время, мин
1	Удаление $(MeO)_2Tr$ -группы	$CHCl_2COOH$ в $C_2H_4Cl_2$ или CF_3COOH в смеси $C_2H_4Cl_2 - CH_3CN$ (7 : 3), 5—7 мл	1—1,5 4
2	Промывка	$C_2H_4Cl_2$, 5 мл	2
3	Конденсация	Реакционная смесь **, 0,3 мл	2—5
4	Промывка	$C_2H_4Cl_2$, 5 мл	2

* Вместо дихлорэтана может быть использован хлороформ, дихлорметан или ацетонитрил.

** Нуклеотидный компонент (30 мкмоль) высушивали упариванием с безводным растворителем, прибавляли раствор арилсульфонилхлорида или арилсульфонилнитротриазолида (60—75 мкмоль) в NC (120—150 мкмоль) в том же растворителе и реакционную смесь прибавляли к 100 мг полимера на основе стекла или силикагеля с иммобилизованным нуклеозидом (20—50 мкмоль нуклеозида/г) (или к 5—10 бумажным дискам). При работе с бумажными дисками межнуклеотидные конденсации проводили в пиридине.

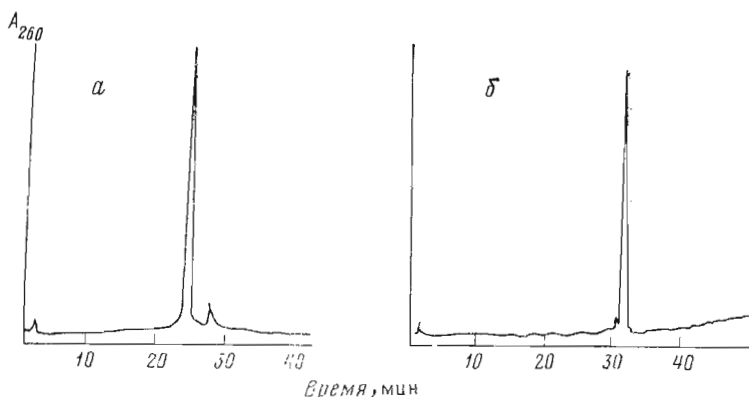


Рис. 4. Проверка гомогенности олигонуклеотидов обращенно-фазовой хроматографией на колонке с Zorbax C-8 (4×250 мм) в градиенте концентрации метанола (5–35%) в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин: а – CGTGTAGTAG-TCAATC; б – AACATCAGCSTTTGTCAATC

Таким образом, разработанный быстрый фосфотриэфирный метод, включающий в себя использование для создания межнуклеотидной связи стандартных конденсирующих реагентов в присутствии сильных нуклеофильных катализаторов — производных N-окиси пиридина (III) или N-окиси хинолина (IV), значительно сокращает время, необходимое для проведения синтеза каждого отдельного олигонуклеотида.

Выходы олигонуклеотидов, полученных с применением O-нуклеофильных катализаторов, не уступают выходам, получаемым обычно при работе с 4-метилимидазолом (I). В то же время ввиду низкой степени модификации гетероциклических оснований нуклеозидов в присутствии соединений (III) и (IV) устраняется необходимость введения дополнительных защитных групп в гетероциклы исходных мономеров, что предлагалось различными исследователями для предотвращения протекания побочных реакций в классическом варианте фосфотриэфирного подхода [10].

До последнего времени наиболее скоростным методом синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях являлся триэфирный фосфитный [13]. Однако в результате проведенных усовершенствований быстрый фосфотриэфирный метод не уступает фосфитному по скорости (время межнуклеотидной конденсации на полимерных носителях в присутствии O-нуклеофильных катализаторов в зависимости от применяемого конденсирующего агента составляет 2–5 мин). Кроме того, как уже было показано ранее [2], при его применении упрощается обслуживание процесса синтеза, поскольку имеется возможность проведения всех реакций синтетического цикла на полимере в одном и том же растворителе.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеотиды (Sigma, США), 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, мезитилсульфохлорид, 1-метилимидазол, 4-диметиламинопиридин (Merck, ФРГ), пластины с силикагелем для ТСХ UV₂₅₄ (Eastman Kodak, США). Защищенные нуклеозиды синтезировали, как описано в работе [4]. 4-Замещенные производные N-окиси пиридина (III) получали согласно [14]. ТСХ на силикагеле проводили в системе хлороформ — метанол (19:1). Синтез хлорфениловых эфиров мононуклеотидов осуществляли, как описано ранее [4].

Обращенно-фазовую хроматографию под высоким давлением проводили на приборе Du Pont Preparative HPLC System 830 (США). 5'-³²P-меченные препараты олигонуклеотидов получали с помощью [γ -³²P]АТФ (Amersham, Англия) и Т4 полинуклеотидкиназы (P-L Biochemicals, США) [4]. Структуры ³²P-меченых олигонуклеотидов подтверждали методом химических модификаций [15].

Полимерные носители на основе стекла (long chain alkyl amine pore glass (Pierce, США), 0,05 ммоль нуклеозида/г) и силикагеля Porasil B (Waters, США; 0,08 ммоль нуклеозида/г) функционализировали, как описано ранее [6], а диски из бумаги Ватман ЗММ (диаметр 4–5 мм) — согласно [7].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили в основном соответственно [6]. Последовательность операций и количества реагентов приведены в табл. 2.

Выделение олигонуклеотидов после удаления защитных групп осуществляли гель-электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины [4, 6]. В качестве электродного буфера использовали 0,05 М трис-борат (рН 8,3) — 1 мМ EDTA. Зоны, содержащие олигонуклеотиды, обнаруживали с помощью УФ-света и вырезали. Гель измельчали и олигонуклеотид элюировали 0,025 М TEAB. Элюат упаривали, остаток обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (Pharmacia, Швеция). Синтез бензтриазолида $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{anCr}(\text{ClPh}) (\text{BT})$ осуществляли согласно [9].

Ацетилирование $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{ibG}$ и ibG проводили в хлористом метиле-не, прибавляя 10-кратный избыток уксусного ангидрида и 1-метилимидазола. Спустя 10 мин при охлаждении до 0° С прибавляли избыток метанола и после нагревания реакционной смеси до 20° С дважды экстрагировали водой. Органический слой упаривали досуха. Выход количественный.

Определение скорости межнуклеотидной конденсации. а) К смеси 0,075 ммоль $\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Bz})$, 0,1 ммоль $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{anCr}(\text{ClPh})$ и 0,4 ммоль нуклеофильного катализатора (I), (IIIa) или (IVa), предварительно обезвоженной азеотропной отгонкой с хлористым метиленом, прибавляли 0,2 ммоль TPS-Cl или MSNT в 1 мл сухого хлористого метилена или пиридина. Реакционную смесь выдерживали при 20° С. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты реакционной смеси, наносили на пластины с силикагелем и хроматографировали в системе хлороформ — метанол (19 : 1). Пластины опрыскивали 10% HClO_4 , зоны, окрашивающиеся в ярко-оранжевый цвет, вырезали и помещали в пробирки с 3 мл 2% трифторуксусной кислоты в CH_3CN . Измеряли поглощение элюатов при 500 нм. Выход продукта конденсации вычисляли, умножая на 133 отношение поглощения элюата из зоны, содержащей продукт конденсации (R_f 0,6), к суммарному оптическому поглощению элюатов всех окрашенных зон. Результаты представлены на рис. 2.

б) К смеси 0,075 ммоль $\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Bz})$ и 0,3 ммоль нуклеофильного катализатора (I) или (IIIa), предварительно обезвоженной двукратным упариванием с сухим хлористым метиленом, прибавляли 1 мл 0,1 М раствора $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{anCr}(\text{ClPh}) (\text{BT})$ в том же растворителе. Реакцию проводили при 20° С. Скорость реакции определяли так же, как в предыдущем опыте.

Определение скорости 6-О-фосфорилирования (Ac)ibG (Ac) (Va).

а) К смеси 0,1 ммоль $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{anCr}(\text{ClPh})$, 0,05 ммоль (Ac)ibG (Ac) (Va) и 0,4 ммоль нуклеофильного катализатора (I), (II) или (IIIa), предварительно высушенной двукратным упариванием с сухим CH_2Cl_2 , прибавляли 0,2 ммоль TPS-Cl или MSNT в 1 мл сухого CH_2Cl_2 или пиридина. В опытах с триэтиламинол последний прибавляли перед конденсирующим реагентом. Реакцию проводили при 20° С. Через определенные интервалы времени аликвоты реакционной смеси наносили на пластины с силикагелем и хроматографировали в системе хлороформ — метанол (19 : 1). Пластины опрыскивали 10% HClO_4 . Окрашенные зоны, содержащие продукт реакции (VIa) (R_f 0,7) и исходный Р-компонент (R_f 0,1), вырезали и помещали в пробирки с 3 мл 2% трифторуксусной кислоты в CH_3CN . Поглощение элюатов измеряли при 500 нм. Выход продукта 6-О-фосфорилирования (VIa) вычисляли, умножая на 200 отношение оптического поглощения элюата из зоны с R_f 0,7 к суммарному оптическому поглощению обоих элюатов. Результаты приведены на рис. 2а.

б) К смеси 0,5 ммоль (Ac)ibG (Ac) (Va) и 0,3 ммоль нуклеофильного катализатора (I), (II) или (IIIa), высушенной двукратным упариванием

с сухим CH_2Cl_2 , прибавляли 1 мл 0,1 М раствора $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_n\text{anCr}(\text{ClPh})$ (BT) в CH_2Cl_2 . При необходимости 0,1 ммоль триэтиламина прибавляли перед Р-компонентом. Реакционную смесь выдерживали при 20° С. Скорость реакции определяли как в предыдущем опыте (рис. 2б).

Определение скорости 6-О-сульфонилирования $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_n\text{ibG}(\text{Ac})$ (Vб). К смеси 0,05 ммоль $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_n\text{ibG}(\text{Ac})$ (Vб) и 0,4 ммоль нуклеофильного катализатора (I), (II), (IIIa) или 0,4 ммоль триэтиламина в 1 мл сухого CH_2Cl_2 прибавляли 0,2 ммоль TPS-Cl или MSNT. Реакцию проводили при 20° С. Через определенные интервалы времени аликвоты реакционной смеси наносили на пластины с силикагелем и хроматографировали в системе хлороформ — метанол (19:1). Пластины опрыскивали 10% HClO_4 . Окрашенные зоны, содержащие продукт реакции (VIб) (R_f 0,75) и исходный нуклеозид (Vб) (R_f 0,5), вырезали и помещали в пробирки с 3 мл 2% CF_3COOH в CH_3CN . Поглощение элюатов измеряли при 500 нм. Выход продукта 6-О-сульфонилирования вычисляли, умножая на 100 отношение оптического поглощения элюата из зоны с R_f 0,75 к суммарному оптическому поглощению обоих элюатов. Результаты приведены на рис. 3.

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянную помощь в работе и обсуждение полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ohtsuka E., Ikehara M., Soll D. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6553–6570.
2. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 9, p. 961–964.
3. Sproat B. S., Bannwarth W. Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 51, p. 5771–5774.
4. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6675–6694.
5. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 706–710.
6. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369–8387.
7. Matthes H. W. D., Zenke W. M., Grundstrom T., Staub A., Wintzerith M., Chambon P. EMBO Journal, 1984, v. 3, № 4, p. 801–805.
8. Савелова В. А., Белоусова И. А., Лигвиненко Л. М., Яковец А. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 6, с. 1393–1398.
9. Marugg J. E., Traup M., Jhuram P., Hoynig C. F., van der Marel J. H., van Boom J. H. Tetrahedron, 1984, v. 40, № 1, p. 73–78.
10. Reese C. B., Ubasawa A. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 22, p. 2265–2268.
11. Gaffney B. L., Jones R. A. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 22, p. 2257–2260.
12. Reese C. B., Skone P. A. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1984, № 6, p. 1263–1271.
13. Barone A. D., Tang J.-J., Caruthers M. H. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 10, p. 4051–4061.
14. Ochiai E. J. Org. Chem., 1953, v. 18, № 5, p. 534–551.
15. Mazam A. M., Gilbert W. Methods Enzymol., 1980, v. 65, p. 498–560.

Поступила в редакцию
11.11.1985

USE OF OXYGEN-NUCLEOPHILIC CATALYSTS FOR RAPID SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHOTRIESTER METHOD

EFIMOV V. A., CHAKHMAKHEVA O. G.

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

Using various condensing agents in conjunction with powerful oxygen-nucleophilic catalysts, such as 4-substituted derivatives of pyridine N-oxide and quinoline N-oxide, leads to dramatic increase of the phosphotriester bond formation rate and minimizes the amount of by-products caused by the modification of heterocyclic bases. These catalysts allow to perform condensations in different organic solvents (acetonitrile, pyridine, dioxane, chloroform, methylene chloride, dichloroethane, etc.). In the presence of O-nucleophilic catalysts, condensations in solution go to a completion in 0,75–3,0 min under the action of mesitylenesulfonyl chloride, mesitylenesulfonyl 3 nitro-1,2,4-triazolide, or trisopropylbenzenesulfonyl chloride. On polymer supports (pore glass or paper disks) the coupling reactions are complete in 2–5 min. Thus, the overall time for the addition of each nucleotide to a growing chain on solid phase is about 10 min. Furthermore, these catalysts increase three-fold the rate of phosphotriester bond formation in the hydroxybenzotriazole approach.