



УДК 547.9 : 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

VI. АРИЛСУЛЬФОНИЛИМИДАЗОЛИДЫ И -ТРИАЗОЛИДЫ В СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. СИНТЕЗ ДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, ГОМОЛОГИЧНОГО СЕГМЕНТУ 1—10 ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК₁ *

*Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н.,
Коробко В. Г., Чахлахчева О. Г., Шингарова Л. Н.*

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

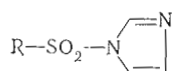
В качестве новой группы конденсирующих реагентов для образования фосфодиэфирной связи предложены *N*-арилсульфонильные производные азолов — *n*-толуолсульфонил-, мезитиленсульфонил- и триизопропилбензолсульфонилимидазол, а также мезитиленсульфонил-1,2,4-триазазол. Показана их эффективность в межнуклеотидных конденсациях и с помощью этих реагентов осуществлен синтез ряда олигонуклеотидов, содержащих до 10 нуклеотидных звеньев.

В настоящее время для создания межнуклеотидных фосфодиэфирных связей обычно используют в качестве конденсирующих средств дициклогексилкарбодимид и арилсульфохлориды. Однако первый из них обладает относительно низкой активностью и, хотя дает хорошие результаты при получении динуклеотидов и некоторых тринуклеотидов, практически непригоден для синтеза высших олигомеров. Арилсульфохлориды, напротив, высокоактивны, но при их применении межнуклеотидная конденсация нередко сопровождается побочными реакциями сульфонилирования и деградации нуклеотидной цепи. В связи с этим более удобными в практическом отношении могут быть конденсирующие реагенты, занимающие по своей активности промежуточное положение между арилсульфохлоридами и дициклогексилкарбодимидом.

Одним из перспективных подходов к созданию таких реагентов представлялась замена в арилсульфохлоридах атома галоида на менее электроотрицательную группу, с тем чтобы несколько понизить электрофильность арилсульфонильного остатка. Действительно, мы нашли, что эффективными конденсирующими средствами для создания межнуклеотидных связей являются арилсульфонильные производные имидазола — TSI, MSI и TPSI, которые легко получают с высоким выходом при взаимо-

* Сообщение V см. [1]; предварительное сообщение см. [2]. В настоящей работе использована система сокращений и символов, рекомендованная комиссией IUPAC-IUB [3]. Прочие сокращения: *ib*, *iB* — изобутирил; TSI — *n*-толуолсульфонилимидазол; MSI — мезитиленсульфонилимидазол; TPSI — триизопропилбензолсульфонилимидазол; MST — мезитиленсульфонил-1,2,4-триазазол; TEAB — триэтиламонийбикарбонат.

действии соответствующих сульфохлоридов с имидазолом в хлороформном растворе в присутствии триэтиламина.

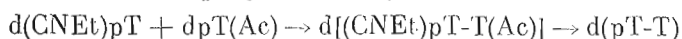


TSI: R = 4-Me-C₆H₄

MSI: R = 2,4,6-Me₃-C₆H₂

TPSI: R = 2,4,6-Pr₃ⁱ-C₆H₂

Выяснение оптимальных условий межнуклеотидной конденсации с участием этих реагентов проводилось нами на примере взаимодействия эквимолекулярных количеств β-цианэтильного производного и 3'-ацетата тимидиловой кислоты в присутствии двух или более



молей арилсульфонилимидазолида в пиридиновом растворе при концентрации нуклеотидного материала 0,1 М. Для анализа алиquotные части реакционной смеси подвергали мягкому щелочному гидролизу, удаляя защитные группы, затем продукты реакции разделяли ионообменной

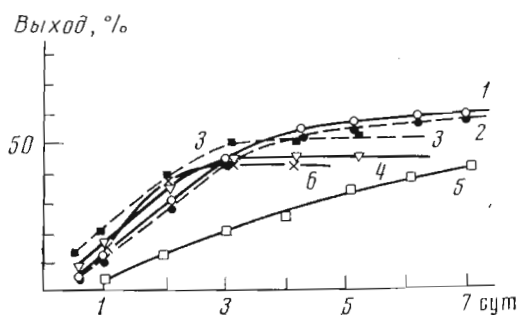


Рис. 1. Синтез динуклеотида d(pT-T) из 1 мкмоль d(CNEt)pT и 1 мкмоль dpT(Ac) под действием арилсульфонилимидазолидов и MSI: 1 — с 2 мкмоль MSI; 2 — с 2 мкмоль MSI в присутствии дауэкса 50 (PyH⁺); 3 — с 2 мкмоль TSI; 4 — с 10 мкмоль MSI; 5 — с 2 мкмоль TPSI; 6 — с 2 мкмоль MSI

хроматографией на DEAE-бумаге в водно-спиртовом растворе TEAB и выход динуклеотида d(pT-T) определяли спектрофотометрически после элюирования с бумаги. Полученные результаты представлены на рис. 1*.

Применение TSI и MSI привело к сходным результатам: через 4—5 сут реакция заканчивалась, тогда как с TPSI конденсация протекала медленнее. Прибавление сухого сульфокатионита дауэкс 50 в пиридиновой форме не вызывало заметного ускорения реакции. При увеличении избытка арилсульфонилимидазолида скорость реакции несколько возрастала, и в присутствии 10 моль MSI количество продукта конденсации достигало максимума через 3 сут. Как и можно было ожидать, выход заметно повышается, если реакцию проводят с избытком нуклеотидного компонента: например, с двукратным избытком dpT(Ac) выход динуклеотида составил 58%, а с пятикратным избытком — 82%. Повышение температуры значительно увеличивает скорость реакции; так, при молярном соотношении d(CNEt)pT — dpT(Ac) — MSI 1 : 1 : 2 конденсация при 20° заканчивается за 4—5 сут, при 30° — за 36 ч, а при 40° — за 12 ч.

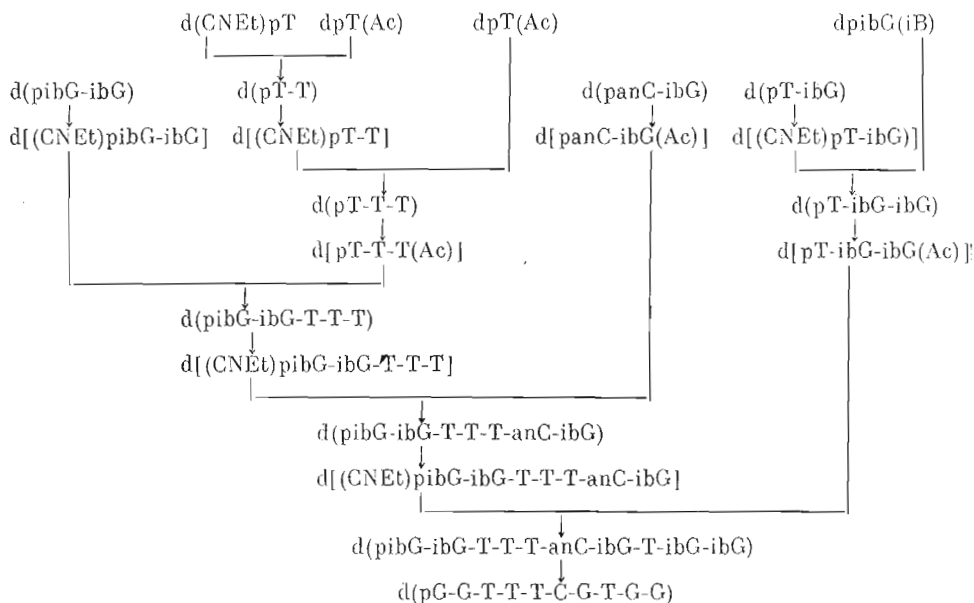
Важными достоинствами арилсульфонилимидазолидов являются мягкость действия (они не вызывают осмоления нуклеотидного материала) и инертность в реакциях сульфонилирования. Так, при действии на 3'-незащищенный нуклеозид d(MeOTr)bzG десятикратным избытком TSI, MSI или TPSI в пиридиновом растворе при комнатной температуре никаких продуктов сульфонилирования не было обнаружено даже через неделю (с мезитилсульфохлоридом в этих условиях реакция сульфонилирования уже за 12 ч проходит более чем на 50%). В аналогичных условиях не наблюдалось также сульфонилирования N-незащищенного нук-

* Вследствие трудности создания абсолютно сухой среды при проведении реакции с малыми количествами вещества выходы в некоторых из этих опытов, вероятно, ниже, чем те, которые могут быть получены при соответствующих препаративных синтезах.

леозида d(MeOTr)A, что свидетельствует об инертности арилсульфонилимидазолидов по отношению не только к вторичным спиртовым гидроксилам углеводных остатков, но и к аминогруппам гетероциклических оснований. Таким образом, в использованных нами условиях межнуклеотидной конденсации под действием сульфонилимидазолидов возможность побочной реакции сульфонилирования полностью исключается.

Препаративные возможности олигонуклеотидного синтеза с применением сульфонилимидазолидов в качестве конденсирующих средств были нами исследованы главным образом на примере мезитиленсульфонилимидазолида. С помощью этого реагента был синтезирован декануклеотид d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G), структурно гомологичный участку 1—10 дрожжевой tPHK₁^{Val}.

План синтеза состоял в ступенчатом удлинении олигонуклеотидной цепи путем последовательного присоединения к 5'-концевому динуклеотиду d(pibG-ibG) тринуклеотида d(pT-T-T), затем динуклеотида d(panC-ibG) и, наконец, тринуклеотида d(pT-ibG-ibG) (см. схему). В синтезе



использовались обычные защитные группы: анизоильная и изобутирильная для аминогрупп, соответственно, цитидина и гуанозина, ацетильная для 3'-гидроксила и β-цианэтильная для 5'-фосфата [4]. Синтез динуклеотидов d(pibG-ibG) и d(panC-ibG) был описан нами ранее [5]. Один из необходимых тринуклеотидов был синтезирован из тимидиловой кислоты ее последовательным превращением в динуклеотид d(pT-T) (выход 82%) и d(pT-T-T) (выход 38%). Второй тринуклеотид, d(pT-ibG-ibG), был получен с выходом 63% из d(pT-ibG). Взаимодействие 5'-концевого динуклеотида d(pibG-ibG) с тринуклеотидом d(pT-T-T) привело к пента-нуклеотиду d(pibG-ibG-T-T-T) (выход 37%), который далее был превращен с выходом 40% в гептануклеотид d(pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG) (рис. 2). Заключительная конденсация этого олигонуклеотида с тринуклеотидом d(pT-ibG-ibG) привела с выходом 25% к желаемому декануклеотиду d(pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG-T-ibG-ibG) (рис. 3).

Все межнуклеотидные конденсации проводились с 2—5-кратным избытком MSI (по отношению к нуклеотидному компоненту) в пиридиновом растворе в течение 4—5 сут при комнатной температуре. Реакции прекращали добавлением воды при сильном охлаждении. После этого защитные группы с 5'-фосфатного остатка и 3'-гидроксила удаляли мягким щелочным гидролизом, раствор нейтрализовали сульфокатионитом в пири-

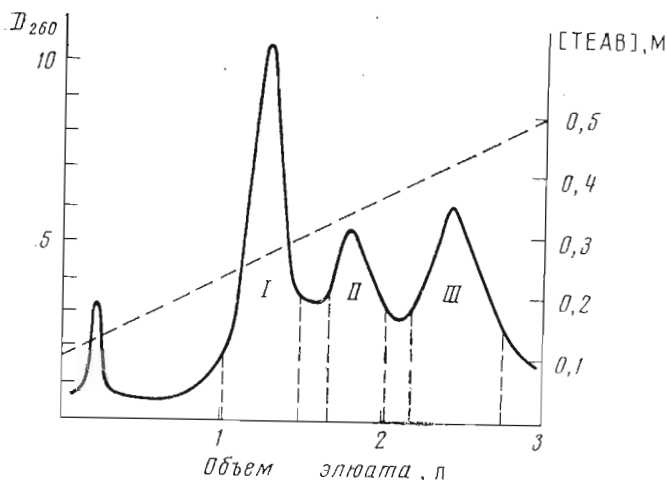


Рис. 2. Выделение гептануклеотида $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG})$. Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $1,5 \times 55$ см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте; скорость элюции 70 мл/ч, объем фракций 10 мл. Пик I содержит 4000 OE_{260} $d(\text{pibC-ibG})$, пик II — 1300 OE_{260} $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-T})$, пик III — 2600 OE_{260} $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-T-anC-ibG})$

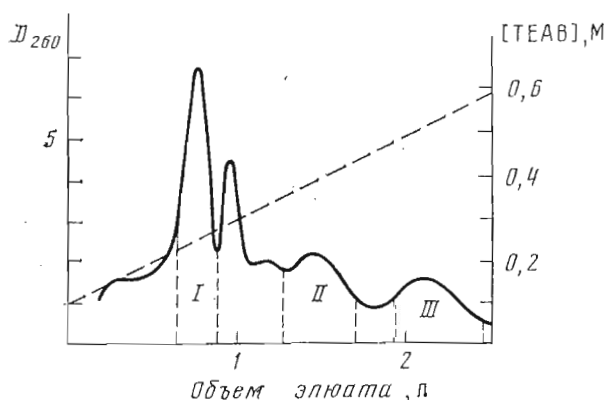


Рис. 3. Выделение декануклеотида $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-T-anC-ibG-ibG})$. Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $1,5 \times 55$ см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте; скорость элюции 60 мл/ч, объем фракций 10 мл. Пик I содержит 900 OE_{260} $d(\text{pT-ibG-ibG})$, пик II — 600 OE_{260} $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-T-anC-ibG})$, пик III — 500 OE_{260} декануклеотида

диниевой форме и смесь продуктов реакции хроматографировали на слабом анионите (DEAE-целлюлоза или DEAE-сефадекс) и в градиенте концентрации TEAB. Конечный декануклеотид после удаления N-защитных групп аммонолизом очищали ионообменной хроматографией по методу Томлинсона — Тенера [6] на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- -форма) в градиенте концентрации NaCl в нейтральном забуференном растворе 7 M мочевины (рис. 4) и затем рехроматографировали тем же способом.

Выделенные олигонуклеотиды были охарактеризованы спектрально, хроматографией на бумаге и микроколоночной ионообменной хроматографией (см. рис. 5), а также (после удаления N-защитных групп) исчезающим ферментативным гидролизом с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы в ранее описанных условиях [7].

В развитие исследований по новым конденсирующим реагентам для нуклеотидного синтеза нами тем же способом, что и имидазолиды, был

Рис. 4. Выделение декануклеотида d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 1 × 30 см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М моче­вине (0,02 М трис-HCl, pH 7,5); скорость элюции 45 мл/ч, объ­ем фракций 7,5 мл. Централь­ная часть пика содержит 200 ОЕ₂₆₀ декануклеотида

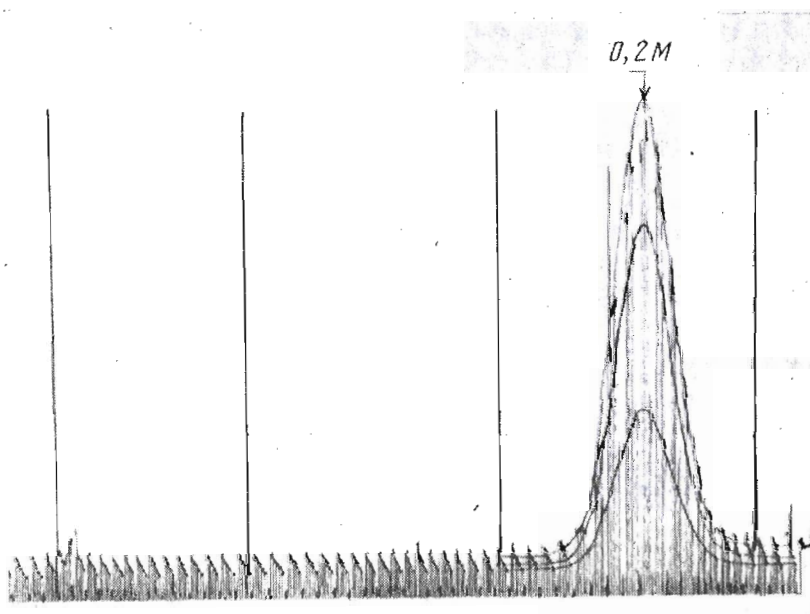
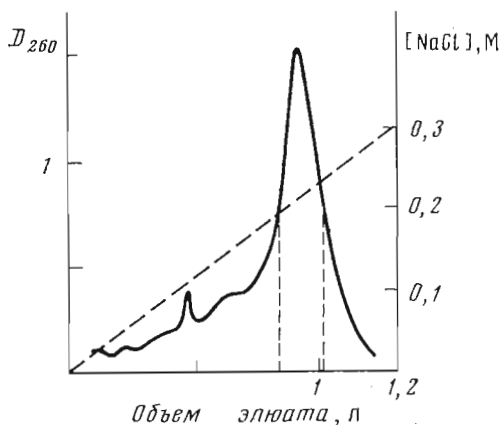


Рис. 5. Микроколоночная хроматография декануклеотида d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G). Колонка с DEAE-целлюлозой (Cl⁻) 0,8 × 80 мм; градиент концентрации NaCl в 7 М моче­вине, содержащей 0,01 М трис-HCl, pH 7,5 (0—0,3 М, общий объем элюента 600 мкл); скорость элюции 300 мкл/ч. Запись на спектрофотометрической приставке МСФП-1 (при чувствительности 1 ОЕ/шкала) с циклической сменой длины волны (250, 260, 270, 280 и 290 нм)

получен MST и изучены его свойства на примере синтеза динуклеотида d(pT-T) [8]. Оказалось, что как конденсирующее средство MST несколько более активен, чем MSI, и для завершения реакции с его участием достаточно 2 сут (см. рис. 1). Однако при действии избытка MST на d(MeOTr)bzA и d(MeOTr)A в тех же условиях наблюдается сульфонирование свободного гидроксила и аминогруппы нуклеозида, что, по-видимому, делает этот реагент менее перспективным, чем имидазолиды*.

Мезитилсульфонилтриазолид был использован нами в качестве конденсирующего реагента при синтезе таких олигонуклеотидов, как

* Одновременно с нашей работой [8] получение и использование арилсульфонилтриазолидов в синтезах олигонуклеотидов было описано Нарангом и соавт. [9].

d[(MeOTr)T-T], d(pT-ibG), d(panC-bzA) и d[(MeOTr)bzG-T-T-anC-ibG], полученных, соответственно, с выходами 60, 41, 35 и 26%. Межнуклеотидные конденсации и выделение олигонуклеотидов проводили в этом случае аналогично синтезам с помощью MSI, но продолжительность реакции составляла 2 сут.

Таким образом, арилсульфонилимидазолиды и -триазолиды могут быть наряду с арилсульфонилхлоридами использованы для препаративного химического синтеза олиго- и полинуклеотидных блоков.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [1]. В работе использовали монодезоксирибонуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР (Новосибирск). Ионообменную хроматографию проводили на DEAE-целлюлозе DE-23 или DE-32 и DEAE-сефадексе А-25, распределительную хроматографию — нисходящим способом на бумаге FN1 в системах: EtOH — 1 M AcONH₄ 7 : 3, pH 7,5 (система А), *n*-PrOH — конц. NH₃ — H₂O 55 : 10 : 35 (система Б). УФ-спектры измеряли в нейтральных водных растворах (см. таблицу). Цианэтильные и ацетильные производные моно- и олигонуклеотидов получали, как описано в работе [10], а монометокситритильные производные — как описано в [11]. Защитные группы с гетероциклических оснований удаляли обработкой конц. водным NH₃ в течение 3 сут при комнатной температуре или 5 ч при 50°. Монометокситритильную группу удаляли действием 80%-ной уксусной кислоты в течение 1 ч при комнатной температуре. Условия проведения микроколоночной хроматографии с использованием микроспектрофотометрической приставки МСФП-1 см. [12].

1. Арилсульфонилимидазолиды. а) *n*-Толуолсульфонилимидазолид. К смеси 11,5 г (0,06 моль) *n*-толуолсульфохлаорида и 4,1 г (0,06 моль) имидазола в 60 мл хлороформа при охлаждении прибавили 8,4 мл (0,06 моль) триэтиламина. Реакционную смесь выдержали 1 ч при 20°, упарили. к

Свойства полученных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	R _{dpT}		УФ-спектр (в воде)				
	в системе А	в системе Б	λ _{макс} , нм	ε ₂₆₀ /ε ₂₈₀	ε ₂₇₀ /ε ₂₆₀	ε ₅₅₀ /ε ₂₆₀	ε ₂₉₀ /ε ₂₆₀
d(pT-T)	0,90		267				
d[(MeOTr)T-T]	1,80						
d(T-T)	1,40		267				
d(pT-ibG)	1,27		261	0,75	0,90	0,72	0,43
d(pT-G)		0,65	259	0,94	0,92	0,71	0,28
d(panC-bzA)	1,00		286	0,89	1,16	1,47	1,85
d(pC-A)		0,80	262	0,80	0,88	0,52	0,10
d(pT-T-T)	0,60		267				
d(pT-ibG-ibG)	1,20		258	0,87	0,86	0,70	0,45
d(pT-G-G)		0,35	255	1,01	0,84	0,63	0,30
d(pibG-ibG-T-T-T)	0,50		262	0,80	0,93	0,70	0,42
d(pG-G-T-T-T)		0,25	262	0,89	0,93	0,69	0,30
d[(MeOTr)bzG-T-T-anC-ibG]	1,40		264	0,84	0,99	0,89	0,63
d(G-T-T-C-G)		0,53	263	0,91	0,95	0,79	0,30
d(pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG)	0,30		263	0,81	0,89	0,80	0,59
d(pG-G-T-T-T-C-G)		0,14	259	0,90	0,92	0,71	0,34
d(pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG-T-ibG-ibG)	0,17		262	0,82	0,90	0,79	0,54
d(pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G)		0,10	259	0,92	0,93	0,73	0,31

остатку прибавили 100 мл бензола, раствор отфильтровали от хлоргидрата триэтиламина и упарили досуха, а остаток перекристаллизовали из 0,5 л гексана. Выход MST 13 г (97%), т. пл. 78—79° (ср. [13]).

б) Мезитиленсульфонилимидазолд получили аналогично с выходом 93%, т. пл. 97—99°.

Найдено, %: С 57,8; Н 5,7; N 11,0; S 12,8. $C_{12}H_{14}N_2O_2S$. Вычислено, %: С 57,8; Н 5,6; N 11,2; S 12,8.

в) Триизопропилбензолсульфонилимидазолд получили аналогично с выходом 94%, т. пл. 116—117°.

Найдено, %: С 64,6; Н 7,7; N 8,3; S 9,8. $C_{18}H_{26}N_2O_2S$. Вычислено, %: С 65,0; Н 7,8; N 8,4; S 9,6.

2. Мезитиленсульфонил-1,2,4-триазолд. К 4,36 г (0,02 моль) мезитиленсульфохлаорида в 20 мл тетрагидрофурана прибавили 2,76 г (0,04 моль) 1,2,4-триазола в 20 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20°, упарили досуха, полученный остаток перекристаллизовали из 0,2 л смеси бензол — циклогексан 1 : 3. Выход MST 6,5 г (75%), т. пл. 135°.

Найдено, %: С 53,0; Н 5,3; N 16,9; S 12,6. $C_{11}H_{13}N_3O_2S$. Вычислено, %: С 52,7; Н 5,2; N 16,7; S 12,8.

3. *d(pT-T)*. К смеси пиридиниевых солей *d(CNEt)pT* (50 мг, 0,1 ммоль) и *dpT(Ac)* (200 мг, 0,55 ммоль) в 1 мл абс. пиридина прибавили 275 мг (1,1 ммоль) MSI и смесь оставили на 5 сут при 20°. Затем при охлаждении до -10° прибавили 1 мл воды и 2 мл 2 н. NaOH, раствор оставили на 10 мин при 0°, нейтрализовали избытком дауэкса-50 (PyH⁺) до pH 8, смолу отфильтровали и промыли 2 М водным пиридином. Объединенный фильтрат нанесли на колонку с DEAE-сефадексом (HSO_3^- , 0,5 × 15 см), предварительно уравновешенную 0,05 М TEAB. Хроматографировали в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (0,2 л 0,05 М — 0,2 л 0,3 М), собирая фракции по 8 мл/15 мин. Фракции 22—32 объединили, разбавили вдвое пиридином и упарили, остаток растворили в 25 мл пиридина и осадили эфиром. Выход динуклеотида *d(pT-T)* 1580 ОЕ₂₆₇ (82%), нуклеотидный состав: *dT* — *dpT*, 1,0 : 0,98. Возврат *dpT* 72%.

4. *d[(MeOTr)T-T]* получили конденсацией 290 мг (0,56 ммоль) *d(MeOTr)T* и 122 мг (0,28 ммоль) *dpT(Ac)* в присутствии 300 мг (1,2 ммоль) MST в 2 мл абс. пиридина в течение 2 сут при комнатной температуре. Реакцию прекращали прибавлением равного объема воды и проводили выделение экстракционным методом [14]. Через 12 ч реакционную смесь упарили досуха, остаток растворили в 50 мл 1 М TEAB и проэкстрагировали последовательно 100 мл порциями эфира, этилацетата и смеси этилацетат — *n*-бутанол 7 : 3. Последний экстракт, содержащий динуклеозидмонофосфат, упарили, остаток растворили в пиридине и осадили эфиром. Выход *d[(MeOTr)T-T]* 155 мг (60%), нуклеотидный состав: *dT* — *dpT* 1,0 : 0,99. Возврат *d(MeOTr)T* 65%, *dpT* 15%.

5. *d(pT-ibG)* а) Получили конденсацией 1,05 г (2,5 ммоль) *d(CNEt)pT* и 1,42 г (3, 5 ммоль) *dpibG(ib)* в присутствии 1,75 г (7 ммоль) MSI в условиях опыта 3. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HSO_3^- , 2,5 × 50 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (4 л 0,05 М — 4 л 0,2 М), собирая фракции по 16,5 мл/10 мин. Из фракций 200—310 выделили 21 200 ОЕ₂₆₀ (33%) *d(pT-ibG)*. Возврат *dpT* 60%, *dpibG* — 23%. После удаления изобутирильной группы получили *d(pT-G)*, нуклеотидный состав: *dpT* — *dpG* 0,97 : 1,0.

б) Получили конденсацией 0,77 г (1,5 ммоль) *d(CNEt)pT* и 1,2 г (2,2 ммоль) *dpibG(ib)* в присутствии 1,65 г (6,6 ммоль) MST в условиях опыта 4. Хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HSO_3^- , 2,5 × 25 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (2 л 0,05 М — 2 л 0,35 М), собирая фракции по 15 мл/6 мин. Из фракций 145—180 выделили 14 300 ОЕ₂₇₀ (41%) *d(pT-ibG)*. Возврат *dpT* 45%, *dpibG* — 68%.

6. $d(\text{panC-bzA})$ получили конденсацией 0,85 г (1,5 ммоль) $d(\text{CNet})\text{panC}$ и 0,88 г (1,6 ммоль) $\text{dprbzA}(\text{Ac})$ в присутствии 1,2 г (4,8 ммоль) MST в условиях опыта 4. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 3×20 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (2 л 0,05 М — 2 л 0,4 М), собирая фракции по 16 мл/5 мин. Из фракций 190—215 выделили 18 000 OE_{280} (35%) $d(\text{panC-bzA})$. Возврат dprbzA 70%, dpanC — 45%. В результате аммонолиза получили $d(\text{pC-A})$, нуклеотидный состав: $\text{dpc} - \text{dpa}$ 1,0 : 0,97.

7. $d(\text{pT-T-T})$ получили конденсацией 130 мг (0,145 ммоль) $d[(\text{CNet})\text{pT-T}]$ и 300 мг (0,67 ммоль) $\text{dprT}(\text{Ac})$ в присутствии 350 мг (1,4 ммоль) MSI в условиях опыта 3. Хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO_3^- , 1×30 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (0,6 л 0,05 М — 0,6 л 0,4 М), собирая фракции по 11 мл/15 мин. Из фракций 70—87 выделили 1900 OE_{267} (45%) $d(\text{pT-T-T})$, нуклеотидный состав: $\text{dT} - \text{dPT}$ 1,1 : 2. Возврат dprT 75%, $d(\text{pT-T})$ — 55%.

8. $d(\text{pT-ibG-ibG})$ получили конденсацией 450 мг (0,40 ммоль) $d[(\text{CNet})\text{pT-ibG}]$ и 490 мг (0,87 ммоль) $\text{dpribG}(\text{iB})$ в присутствии 450 мг (1,8 ммоль) MSI в условиях опыта 3. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×35 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (2 л 0,05 М — 2 л 0,36 М), собирая фракции по 14 мл/14 мин. Из фракций 140—205 выделили 6000 OE_{260} (63%) $d(\text{pT-ibG-ibG})$. Возврат dpribG 42%, $d(\text{pT-ibG})$ — 33%. После аммонолиза получили $d(\text{pT-G-G})$, нуклеотидный состав: $\text{dpg} - \text{dPT}$ 2,0 : 1,0.

9. $d(\text{pibG-ibG-T-T-T})$ получили конденсацией 300 мг (0,24 ммоль) $d[(\text{CNet})\text{pibG-ibG}]$ и 450 мг (0,4 ммоль) $d[\text{pT-T-T}(\text{Ac})]$ в присутствии 250 мг (1 ммоль) MSI в условиях опыта 3. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×35 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10%-ном спирте (1,2 л 0,05 М — 1,2 л 0,5 М), собирая фракции по 12 мл/14 мин. Из фракций 120—170 выделили 5400 OE_{260} (38%) пентануклеотида; возврат $d(\text{pibG-ibG})$ 50%, $d(\text{pT-T-T})$ — 40%. После аммонолиза получили $d(\text{pG-G-T-T-T})$, нуклеотидный состав: $\text{dPT} - \text{dPG}$ 3,0 : 1,9.

10. $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T-anC-ibG}]$ получили конденсацией 0,7 г (0,5 ммоль) $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T}]$ и 1,73 г (1,73 ммоль) $d[(\text{panC-ibG}(\text{Ac}))]$ в присутствии 1,65 г (6,6 ммоль) MST в условиях опыта 4. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 3×20 см) в градиенте концентрации TEAB и спирта (1,5 л 0,3 М TEAB в воде; 2 л 0,05 М — 2 л 0,45 М TEAB в 50%-ном спирте), собирая фракции по 15 мл/5 мин. Из фракций 125—155 выделили 8000 OE_{260} (26%) пентануклеозидтетрафосфата. Возврат $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T}]$ 40%, $d(\text{panC-ibG})$ — 65%. После удаления защитных групп получили $d(\text{pG-T-T-C-G})$, нуклеотидный состав: $\text{dG} - \text{dPG} - \text{dPT} - \text{dPC}$ 1,0 : 1,0 : 2,0 : 1,1.

11. $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG})$ получили из 230 мг (88 мкмоль) $d[(\text{CNet})\text{pibG-ibG-T-T-T}]$ и 190 мг (0,18 ммоль) $d[(\text{panC-ibG}(\text{Ac}))]$ в присутствии 100 мг (0,4 ммоль) MSI в 3 мл пиридина в условиях опыта 3. Условия хроматографии и кривая хроматографического разделения приведены на рис. 2. Выход гептануклеотида 2600 OE_{260} (40%). Возврат динуклеотида 80%, пентануклеотида — 26%. После удаления защитных групп аммонолизом получили $d(\text{pG-G-T-T-T-C-G})$, нуклеотидный состав: $\text{dPT} - \text{dPC} - \text{dPG}$ 3,0 : 0,9 : 2,85.

12. $d(\text{pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG-T-ibG-ibG})$ получили из 60 мг (16 мкмоль) $d[(\text{CNet})\text{pibG-ibG-T-T-T-anC-ibG}]$ и 160 мг (0,11 ммоль) $d[(\text{pT-ibG-ibG}(\text{Ac}))]$ в присутствии 80 мг (0,32 ммоль) MSI в 1,5 мл пиридина по методике опыта 3. Условия хроматографии и кривая хроматографического разделения приведены на рис. 3. Выход декануклеотида 500 OE_{260} (25%); возврат тринуклеотида 20%, гептануклеотида — 36%.

13. $d(\text{pG-G-T-T-T-C-G-T-G-G})$. Раствор 390 OE_{260} декануклеотида из опыта 12 в 2 мл. конц. NH_3 выдержали 72 ч при 20°, затем 2 ч при 50° и

упарили. Остаток растворили в 2 мл 7 М мочевины (0,02 М трис-HCl, pH 7,5) и хроматографировали на DEAE-целлюлозе в условиях, указанных на рис. 4. Фракции из центральной части пика объединили, разбавили водой в 3 раза и нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×5 см). Колонку отмыли 0,05 М ТЕАВ от ионов Cl^- , после чего вещество элюировали 20 мл 1 М ТЕАВ и элюат несколько раз упарили со спиртом для полного удаления триэтиламина. Выход декануклеотида 200 OE_{260} (80%); результаты анализа на гомогенность методом микроколоночной хроматографии приведены на рис. 5. Нуклеотидный состав: $\text{dpT} - \text{dpG} - \text{dpC}$ 4,0 : 4,9 : 1,3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чупрунова О. А. (1975) *Биоорганическая химия*, 1, печатается в этом номере, стр. 1113—1120.
2. Berlin Yu. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A., Kolosov M. N., Korobko V. G. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 1353—1354.
3. Eur. J. Biochem. (1970) 15, 203—208.
4. Agarwal K. L., Yamazaki A., Cashion P. J., Khorana H. G. (1972) *Angew. Chem.*, 84, 489—498.
5. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А., Чахмакчева О. Г., Чупрунова О. А. (1973) *Химия природных соединений*, 402—410.
6. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 2644—2645.
7. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, 39, 747—751.
8. Чахмакчева О. Г. (1974) Синтез декадезоксирибонуклеотида, гомологичного 5'-концевому сегменту тРНК^{Val}, стр. 58—62, канд. дис., М.
9. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1974) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325—326.
10. Бадашкева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кнорре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) *Химия природных соединений*, 394—402.
11. Weber H., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 72, 219—250.
12. Кузьмин С. В. (1973) в сб. *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (под ред. Кнорре Д. Г. и Венкстери Т. В.), стр. 95—103, «Наука», М.; Грачев М. А., там же, стр. 104—122.
13. Staab H. A., Wendel K. (1960). *Chem. Ber.*, 93, 2902—2915.
14. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) *J. Biol. Chem.*, in press.

Поступила в редакцию
3.II.1975

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. VI. ARENESULFONYL IMIDAZOLIDES AND -TRIAZOLIDES IN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. THE SYNTHESIS OF THE DECADEOXYRIBONUCLEOTIDE HOMOLOGOUS TO THE 1-10 SEGMENT OF THE YEAST tRNA^{Val}

BERLIN Yu. A., EFIMOV V. A., KOLOSOV M. N.,
KOROBKO V. G., CHAKHMAKHCHEVA O. G., SHINGAROVA L. N.

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

N-Arenesulfonyl azolides—toluenesulfonyl imidazolid, mesitylenesulfonyl imidazolid, 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl imidazolid and mesitylenesulfonyl 1,2,4-triazolid have been proposed as a new group of condensing reagents for phosphodiester bond formation. Their effectiveness in internucleotide condensation has been demonstrated by synthesizing a number of oligonucleotides up to a decamer.