



УДК 577.113.6

НОВЫЕ АКТИВАТОРЫ ДЛЯ ФОСФИТАМИДНОГО
СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ© 1996 г. В. А. Ефимов[#], А. Л. Калинкина, О. Г. ЧахмахчеваИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 22.08.95 г.

Показано, что 1-замещенные 5-меркаптотетразолы являются высокоэффективными катализаторами для стадии конденсации в фосфитамидном методе синтеза олигонуклеотидов.

Ключевые слова: синтез олигонуклеотидов, активаторы фосфитамидов.

Фосфитамидный метод синтеза олигонуклеотидов [1, 2] за последние годы стал одним из наиболее широко используемых и эффективных химических способов получения фрагментов нуклеиновых кислот. Ключевая стадия этого метода – взаимодействие 3'-фосфитамида 5'-диметокситриптилнуклеозида (I) с 5'-гидроксильной группой растущей нуклеотидной цепи, присоединенной к полимерному носителю, в присутствии кислотного катализатора, в качестве которого чаще всего используется 1*H*-тетразол. Было показано, что первой, лимитирующей стадией активации фосфитамида нуклеозида является его протонирование тетразолом. Образующийся при этом положительно заряженный интермедиат (II) подвергается затем нуклеофильной атаке второй молекулой тетразола и превращается в соответствующий *N*-тетразолофосфан (III). Последний, вероятно, и является реальной реакционноспособной частицей в ходе образования межнуклеотидной связи [3]. При синтезе олигонуклеотидов на 0.2 - 1-микромольном уровне 1*H*-тетразол позволяет получать выходы более 98% в реакции межнуклеотидной конденсации. Однако при использовании того же катализатора на препаративном уровне, в особенности в случае синтеза олигорибонуклеотидов, а также при синтезе некоторых линкеров пенинуклеотидной природы, содержащих протон-акцепторные группы, становится очевидным, что 1*H*-тетразол уже не является удовлетворительным активатором, поскольку он не обеспечивает выходов на каждой стадии удлинения цепи выше 90 - 95% [4, 5]. Различные модификации синтетического цикла, в частности увеличение времени реакции, избытка *P*-компонента и тетразола, обычно не дают заметного положительного эффекта.

Следует отметить, что потенциальные катализаторы для активации фосфитамидов должны удовлетворять следующим требованиям: обладать хорошей растворимостью в ацетонитриле и других нейтральных органических растворителях, активировать фосфитамидные синтоны с последующим образованием триэфирной фосфитной связи с эффективностью не менее 98 - 99% и быть совместимыми с применением диметокситриптильной группы для защиты 5'-гидроксильной растущей олигонуклеотидной цепи.

Для решения проблемы активации фосфитамидов помимо 1*H*-тетразола были предложены другие катализаторы, в частности такие производные тетразола, как 5-этилтио-1*H*-тетразол (pK_a 4.28) [6] и 5-(*n*-нитрофенил)-1*H*-тетразол (pK_a 3.7) [7]. Было показано, что применение этих более кислых, чем 1*H*-тетразол (pK_a 4.8), катализаторов приводит к увеличению скорости активации фосфитамидов, более высоким выходам целевых олигомеров и улучшает их чистоту. Однако *n*-нитрофенилтетразол плохо растворяется в ацетонитриле, что ограничивает его применение, а 5-этилтиотетразол не обладает достаточной кислотностью для существенного влияния на скорость и эффективность межнуклеотидной конденсации и не является коммерчески доступным соединением.

Ранее было показано, что *N*-замещенные 5-меркаптотетразолы – эффективные нуклеофильные катализаторы в реакциях ацилирования [8, 9]. Проверка нами активности этой группы соединений в фосфитамидном методе показала, что некоторые из них, в частности 1-метил-5-меркаптотетразол (1-метил-2-тетразолин-5-тион, pK_a 3.86) (IVa) и 1-фенил-5-меркаптотетразол (1-фенил-2-тетразолин-5-тион, pK_a 3.65) (IVб), вполне удовлетворяют вышеперечисленным критериям. Эти

[#] Автор для переписки.

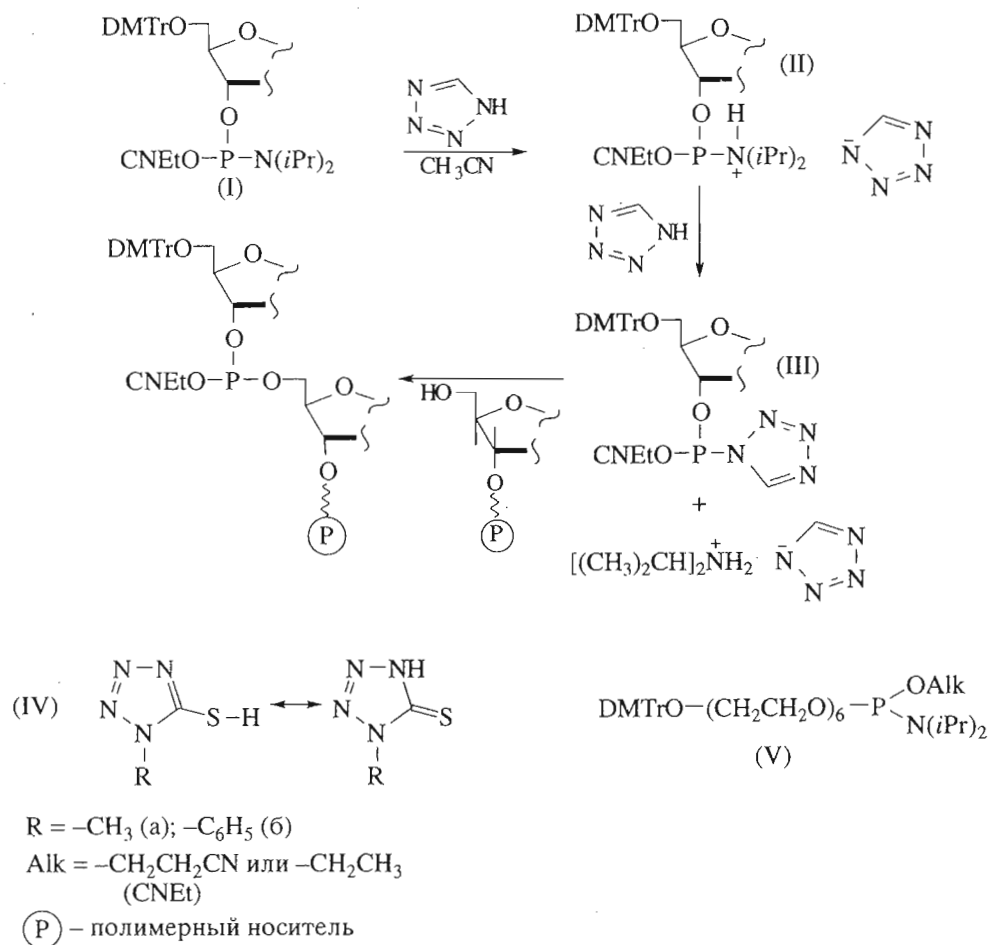


Схема.

соединения очень стабильны, они имеют большую кислотность и значительно лучшую растворимость в ацетонитриле и дихлорметане, чем 1*H*-тетразол [10]. Кроме того, они коммерчески доступны и в несколько раз дешевле 1*H*-тетразола.

В настоящей работе показано, что применение 1-замещенных 5-меркаптотетразолов полностью совместимо с процедурой автоматического фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов. При этом обеспечиваются высокие выходы в межнуклеотидных конденсациях как на аналитическом, так и на препаративном уровнях синтеза. Синтез проводился нами на синтезаторе Applied Biosystems 381A с использованием стандартной программы, предлагаемой фирмой.

Сравнение эффективности прохождения реакции межнуклеотидной конденсации с 1*H*-тетразолом и соединениями (IVа, б) проводилось в параллельном синтезе ряда олигонуклеотидов. При получении олигодезоксирибонуклеотидов на 0.2 - 1-микромольном уровне выходы на отдельных стадиях элонгации цепи во всех случаях составляли более 98% (как было показано спектрофотометрическим анализом количества удаляе-

мой с носителями диметокситритильной группы в условиях работы [11]). При этом качество целевых соединений было практически одинаковым (рис. 1). При синтезе же на 10-микромольном уровне выходы с предлагаемыми активаторами были на каждой стадии наращивания на 2 - 3% выше, чем с 1*H*-тетразолом. Межнуклеотидные конденсации проводили с использованием 0.05 М растворов фосфитамидов и 0.5 М раствора соответствующего тетразола в ацетонитриле в течение 0.5 мин для 0.2 - 1-микромольного уровня и 1 мин для 10-микромольного (и более) уровня синтеза.

Сравнение этих активаторов в синтезе олигорибонуклеотидов показало, что тетразолы (IV) обеспечивали на каждой стадии элонгации выходы не менее 96% при продолжительности конденсации 5 мин. В тех же условиях 1*H*-тетразол за то же время давал выходы не более 90%.

При синтезе линкеров нуклеотидной природы на основе олигоэтиленгликоля из амидофосфитных синтонов типа (V) нам не удалось получить выходов более 55 - 60% на стадию с 1*H*-тетразолом, тогда как с тетразолами (IV) они доходили до 90 - 95% за 3 - 5 мин (рис. 2).

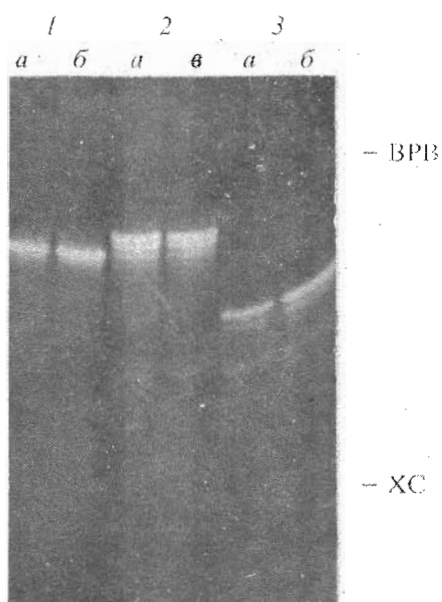


Рис. 1. Электрофорез олигонуклеотидов в 10% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, после удаления защитных групп (без предварительной очистки): а – 39-звенного d(TTTGTCCGACTTACAGATCTAGGTTGAAAGCCATAGTACT) (1), 41-звенного d(AGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGCTGCAGCACCATCACCA) (2) и 33-звенного d(CCGGATTCGGTGCAGTCAAGTAAACAACCATG) (3), полученных на 1-микромольном уровне с применением 1*H*-тетразола (а), 1-метил-5-меркаптотетразола (б) и 1-фенил-5-меркаптотетразола (в). Фотография в УФ-свете после прокрашивания геля этидийбромидом, красители-маркеры: ВРВ (бромфеноловый голубой) и ХС (ксиленцианол).

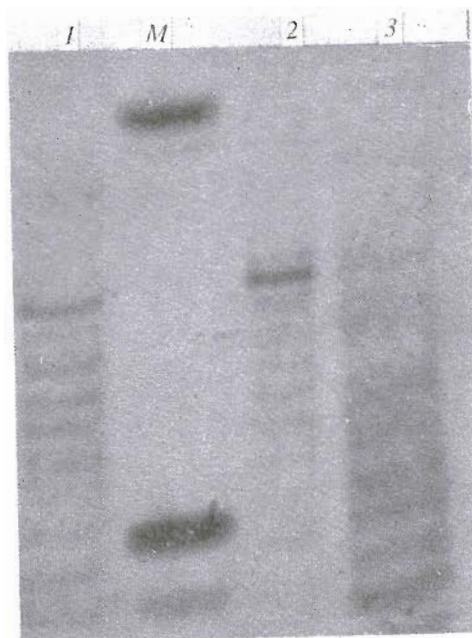


Рис. 2. Электрофорез в денатурирующем 10% ПААГ после удаления защитных групп неочищенного модифицированного олигомера d(TATCGTAC-X₇-TACTC-GAGAC), где X – остаток фосфата гексаэтиленгликоля. Синтез проводился на 10-микромольном уровне с использованием 1*H*-тетразола (1, 3) и 1-метил-5-меркаптотетразола (2), а межнуклеотидные конденсации – в течение 10 (1) или 3 мин (2, 3). Фотография в отраженном УФ-свете. М – красители-маркеры (ВРВ и ХС).

Исследование скорости протекания побочной реакции удаления диметокситритильной защитной группы с 5'-гидроксильных нуклеотидного компонента и вновь образующейся олигонуклеотидной цепи на примере 5'-диметокситритилтимидина в присутствии растворов тетразолов в ацетонитриле показало, что в случае обоих 1-замещенных 5-меркаптотетразолов при эквимольном количестве нуклеозида за 24 ч при 20°C в растворе удалялось не более 10 - 15% диметокситритильной группы, а на твердой фазе при 10-кратном мольном избытке катализатора это количество составляло не более 0.5% за 1 ч, что не оказывает существенного влияния на процедуру синтеза.

Таким образом, предлагаемые в данной работе *N*-замещенные 5-меркаптотетразолы являются эффективными катализаторами для фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов, более активными, чем обычно используемый 1*H*-тетразол. Следует отметить, что они могут быть полезны не только для традиционного варианта этого метода, но и для появившейся в последнее время его разновидности с использованием фосфитамидных нуклеозидов без *N*-защитных групп на гетероциклических основаниях [12]. В настоящее время на-

ми проводится исследование механизма действия таких катализаторов, а также поиск новых подобных соединений.

Авторы признательны д-ру К. Джейараману и д-ру Т. Шмальтц-Хилл (США) за участие на отдельных этапах работы, а также компании "Триплекс Фарм. Корп." (Вудландс, Техас, США) за финансовую поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beaucage S.L., Caruthers M.H.* // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. P. 1859 - 1862.
2. *Wolter A., Biernat J., Koster H.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1986. V. 5. P. 65 - 77.
3. *Berner S., Muhlegger K., Seliger H.* // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 853 - 864.
4. *Gasparutto D., Molko D., Teoule R.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1990. V. 9. P. 1087 - 1098.
5. *Sproat B., Colonna F., Mullah B., Tsou D., Andrus A., Hampel A., Vinayak R.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1995. V. 14. P. 255 - 273.
6. *Andrus A., Beaucage S., Ohms J., Wert K.* // *American Chemical Society Meeting, New York, April 1986, Organic Division, Abstract 333.*

7. Froehler B.C., Matteucci M.D. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 3171 - 3174.
8. Lippmann E., Reifegerste D., Kleinpeter E. // *Z. Chem.* 1974. V. 14. P. 16 - 17.
9. Schmidt U., Dietsche M. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1981. V. 20. P. 771 - 772.
10. Lieber E., Enkoji T. // *J. Org. Chem.* 1961. V. 26. P. 4472 - 4479.
11. Atkinson T., Smith M. // *Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach.* Oxford: IRL Press, 1984. P. 35 - 82.
12. Gryaznov S.M., Letsinger R.L. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 1879 - 1882.

New Activators for the Phosphoramidite Oligonucleotide Synthesis

V. A. Efimov,¹ A. L. Kalinkina, and O. G. Chakhmakhcheva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

Abstract—1-Substituted 5-mercaptotetrazoles were shown to be highly efficient catalysts for the condensation in the phosphoramidite oligonucleotide synthesis.

Key words: oligonucleotide synthesis, activators of phosphoramidite.

¹ To whom correspondence should be addressed.