



УДК 547.963.32.07:543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВXV \*. РОЛЬ ПИРИДИНА В ТРИЭФИРНОМ МЕТОДЕ ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*Зарытова В. Ф., Шишкин Г. В.**Институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск**Халимская Л. М.**Новосибирский государственный университет*

Исследована роль пиридина в образовании межнуклеотидной связи в триэфирном методе синтеза олигонуклеотидов с помощью *n*-толуолсульфотетразолида и триизопропилбензолсульхохлорида. Показано, что в реакции  $(C_6H_4)_3PT(AC)$  с толуолсульфотетразолидом, приводящей к образованию тетраэфира пирофосфата (II), пиридин играет роль нуклеофильного катализатора. Установлено, что для реакции пирофосфата (II) с нуклеозидом (Tr)T также необходим нуклеофильный катализатор. В отсутствие тетразола роль нуклеофильного катализатора играет пиридин или его производные. При использовании же арилсульфотетразолидов нуклеофильным катализатором взаимодействия тетраэфира пирофосфата с нуклеозидом является тетразол, а пиридин играет роль основного катализатора, акцептируя протон тетразола. Показано, что тетразолид дифенилфосфорной кислоты — аналог предполагаемого промежуточного продукта в катализируемой тетразолом реакции пирофосфата (II) с нуклеозидом — реагирует с (Tr)T в отсутствие пиридина, однако пиридин ускоряет этот процесс, вероятно, по механизму основного катализа.

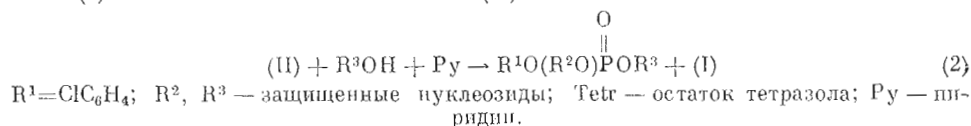
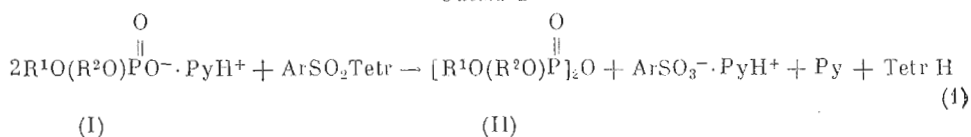
Химический синтез олигонуклеотидов как ди-, так и триэфирным методом обычно проводят в пиридине. Ранее было показано [2], что в диэфирном методе синтеза пиридин входит в состав фосфорилпиридиниевого производного нуклеотидного компонента — промежуточного соединения при образовании фосфодиэфира.

Целью настоящей работы явилось выяснение роли пиридина на отдельных стадиях образования фосфотриэфиров. Поскольку лучшие результаты в триэфирном методе синтеза олигонуклеотидов достигнуты при использовании арилсульфотетразолидов [3—5], в основном рассматривается процесс образования межнуклеотидной связи в присутствии этих конденсирующих реагентов.

Ранее методом  $^{31}P$ -ЯМР была зарегистрирована двустадийность образования межнуклеотидных связей в триэфирном методе синтеза олигонуклеотидов с помощью арилсульхохлоридов и арилсульфотетразолидов [6]. На первой стадии регистрируется быстрое расходование фосфодиэфи-

\* Сообщение XIV — см. [1]. Символ d опущен, так как в статье упоминаются только нуклеозиды и нуклеотиды дезоксирибы.

Схема 1



ра (I) и накопление тетраэфира пирофосфата (II), на второй — существенно более медленное расходование пирофосфата (II) и накопление фосфотриэфира (III) (схема 1).

На втором этапе процесса фосфодиаэфир не регистрируется в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР, так как он быстро реагирует с избытком конденсирующего реагента и не накапливается в смеси в измеримых количествах. Мы исследовали влияние пиридина на обе стадии процесса (схема 1) на примере взаимодействия  $(ClC_6H_4)pT(Ac)$  с 5'-O-тримитилтимидином в присутствии *n*-толуолсульфотетразолида.

За реакцией (1) наблюдали по накоплению пирофосфата (II) или расходованию исходного фосфодиаэфира, определяя интенсивности соответствующих сигналов в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР реакционной смеси (таблица). При смешивании пиридиневой соли  $(ClC_6H_4)pT(Ac)$  с 2,3 экв. *n*-толуолсульфотетразолида в хлористом метиле происходит образование соответствующего тетраэфира пирофосфата. Кинетическая кривая (рис. 1) имеет S-образный характер. Добавление в начальный момент реакции 4 экв. пиридина резко ускоряет процесс. Таким образом, пиридин является катализатором реакции, и наблюдаемая в отсутствие пиридина S-образная кинетическая кривая, очевидно, объясняется автокатализом пиридином, который образуется из пиридиний-катиона по реакции (1).

Как показано в работе [1], первая стадия катализируется добавками толуолсульфокислоты и практически полностью подавляется избытком триэтиламина, поэтому влияние пиридина на стадии (1) не может быть проявлением общего основного катализа. Пиридин ускоряет эту реакцию, по-видимому, как нуклеофильный катализатор за счет образования активного промежуточного катиона  $ArSO_2Py^+$ . Катализ кислотой на стадии (1), вероятно, обусловлен необходимостью протонирования выделяющегося аниона тетразола.

Химические сдвиги  $^{31}P$ -ЯМР исследуемых соединений при 30° С \*

Соединение	δ, м.д.	Растворитель
$(ClC_6H_4)pT(Ac)$ (I)	6,3	Хлористый метилен То же
$(ClC_6H_4)pT(Ac)$ (II)	18,9 **	
$(ClC_6H_4)pT(Ac)$ (Tr)T( $ClC_6H_4$ )pT(Ac) (III)	7,4; 7,7	»
$(C_6H_5)_2pTetr$ (IVб)	21,4	Диоксан
$[(C_6H_5O)_2PO]_2O$	25,5	»
(Tr)Tp( $C_6H_5$ ) <sub>2</sub>	12,8	»

\* Значения химических сдвигов сигналов всех соединений, кроме  $(ClC_6H_4)pT(Ac)$ , в хлористом метиле и диоксане отличаются от соответствующих величин в пиридине [1, 6] не более чем на 0,2 м.д. Различие в величинах химического сдвига сигнала  $(ClC_6H_4)pT(Ac)$  в хлористом метиле и пиридине (где его величина составляет 5,1 м.д.) связано, очевидно, с тем, что диаэфир является ионизированным соединением, поэтому положение соответствующего сигнала сильно зависит от среды.

\*\* Положение центра сигнала, соответствующего смеси стереомеров.

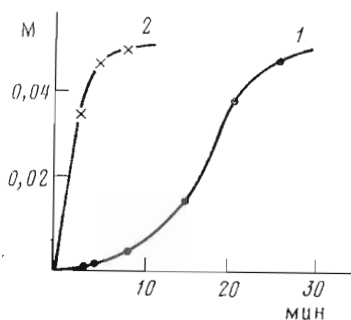
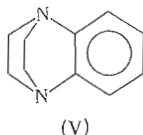


Рис. 1. Кинетические кривые накопления тетраэфира пирофосфата (II) при взаимодействии 0.1 M  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{PT}(\text{Ac})$  с 0.23 M *n*-толуолсульфотетразолидом в хлористом метиле при 30° С: 1 — в отсутствие пиридина; 2 — при добавлении 0.41 M пиридина

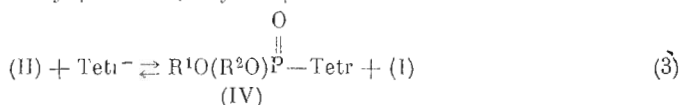
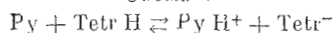
Далее мы исследовали влияние пиридина на стадию (2) — превращение тетраэфира пирофосфата (II) в триэфир (III). В работе [1] было показано, что взаимодействие пирофосфата (II) с нуклеозидом в пиридине катализируется тетразолом. Это позволило предположить, что высокая скорость накопления фосфотриэфиров при использовании арилсульфотетразолидов по сравнению с арилсульфохлоридами связана с образованием активного фосфорилирующего соединения — тетразолида фосфодиаэфира (IV) (схема 2). Вследствие своей высокой реакционной способности тетразолид (IV) не регистрируется в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционных смесей и, значит, присутствует в смеси в низкой стационарной концентрации.

В первую очередь следовало установить, может ли происходить образование триэфира из тетраэфира пирофосфата (II) в отсутствие и тетразола, и свободного пиридина. С этой целью соединение (II) было получено при взаимодействии пиридиниевой соли  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{PT}(\text{Ac})$  с 3 экв. тринизопропилбензолсульфохлорида в присутствии 7 экв. бензо[*b*]-1,4-диазабицикло[2,2,2]октена (V) в хлористом метиле и выдержано с тритилтимидином в течение 1 сут. Соединение (V) близко к пиридину по основности ( $pK_a$  5,6 [7]), но в отличие от пиридина его атомы азота не входят в ароматическую систему.



Без добавления тетразола и пиридина пирофосфат (II) не реагирует с тритилтимидином в присутствии соединения (V) \* (рис. 2). Однако при замене последнего на такое же количество пиридина или  $\gamma$ -пиколина тетраэфир пирофосфата (II) реагирует с нуклеозидом с образованием триэфира (III), причем в случае более основного  $\gamma$ -пиколина реакция идет быстрее, чем в присутствии пиридина.

Схема 2



а)  $\text{R}^1 = \text{ClC}_6\text{H}_4$ ;  $\text{R}^2, \text{R}^3$  — защищенный нуклеозид;

б)  $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{C}_6\text{H}_5$ ;  $\text{R}^3$  — защищенный нуклеозид;

$\text{Tetr}^-$  — анион тетразола.

\* Очевидно, то количество пиридина, которое вносится в реакционную смесь в виде пиридиниевой соли фосфодиаэфира, недостаточно для образования заметного количества триэфира в течение суток.

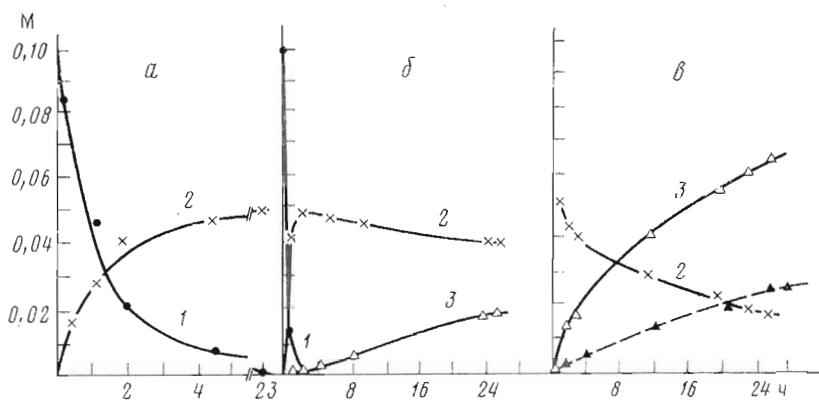


Рис. 2. Кинетические кривые взаимодействия 0,1 М  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{P}(\text{As})$  с 0,1 М тритилтимицином и 0,3 М триизопропилбензолсульфохлоридом в хлористом метиле при  $30^\circ\text{C}$  в присутствии 0,7 М бензодиазациклооктена(V) (а); 0,7 М пиридина (б); 1 М  $\gamma$ -пиколина (в). Для сравнения приведена кривая накопления триэфира (III) в присутствии 1 М пиридина вместо  $\gamma$ -пиколина (пунктирная кривая). 1 —  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{P}(\text{As})$ ; 2 — тетраэтил пирофосфата (II); 3 —  $(\text{Tr})\text{T}(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{P}(\text{As})$

Можно сделать вывод, что для реакции пирофосфата (II) с тритилтимицином необходим нуклеофильный катализатор. В качестве таких катализаторов можно использовать пиридин и его производные —  $\gamma$ -пиколин или 4-N,N-диметиламинопиридин [8].

Далее было исследовано взаимодействие пиридиновой соли  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{P}(\text{As})$  с тритилтимицином и *n*-толуолсульфотетразолидом в хлористом метиле без добавления пиридина. При этом происходит образование пирофосфата (II), но в течение 5 ч в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР не наблюдается появления сигналов триэфира (III). При добавлении же к такой смеси 4 экв. пиридина образуется триэфир (рис. 3). Следовательно, для реакции пирофосфата (II) с нуклеозидом даже в присутствии тетразола необходим пиридин. В работе [1] было установлено, что каталитический эффект тетразола резко усиливается триэтиламино и ослабляется в присутствии *n*-толуолсульфокислоты. Эти данные позволяют предположить, что при использовании  $\text{ArSO}_2\text{Tetr}$  пиридин, так же как и триэтиламин, является основным катализатором, необходимым для акцептирования протона тетразола, а в качестве нуклеофильного катализатора образования триэфира (III) выступает анион тетразола (см. схему 2).

Тетразолид фосфодизфира (IV), вероятно, быстро реагирует с имеющимися в системе нуклеофилами — фосфодизфиром и нуклеозидом — с образованием соответственно пирофосфата (II) (стадия (3), обратная реакция) и триэфира (III) (стадия (4)). При добавлении к смеси 0,1 М  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{P}(\text{As})$  с 0,1 М тритилтимицином и 0,3 М толуолсульфотетразолидом 4 экв. соединения (V) в хлористом метиле происходит образование триэфира (через 5 ч количество триэфира (III) составляет  $\sim 50\%$  от всего фосфора), что соответствует предположению об основном катализе пиридином этой реакции.

Таким образом, если для превращения пирофосфата (II) в триэфир при использовании арилсульфохлоридов пиридин является нуклеофильным катализатором, то при использовании тетразолидов пиридин на этой стадии играет роль основного катализатора, стимулирующего образование аниона тетразола.

Далее на модельной реакции фосфотетразолида (IVб) с тритилтимицином была исследована роль пиридина на стадии (4). Тетразолид (IVб) получен при взаимодействии дифенилхлорфосфата с 4 экв. тетразола и 1 экв. триэтиламина в диоксане [1]. К полученной после фильтрования осадка гидрохлорида триэтиламина смеси фосфотетразолида (IVб) и тетрафенилпирофосфата (23%) добавлен тритилтимицин. При этом из реак-

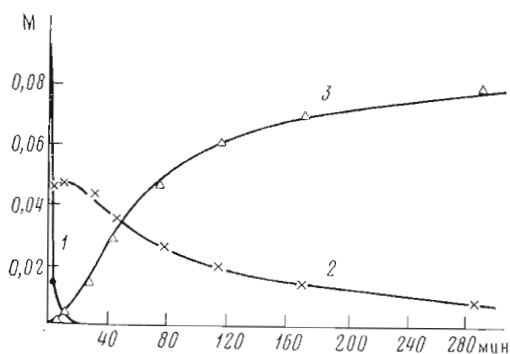


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые реакции 0,1 М  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{pT}(\text{As})$  с 0,1 М тритилтимидином, 0,32 М толуолсульфотетразолидом и 0,43 М пиридином в хлористом метиле при 30° С: 1 —  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{pT}(\text{As})$ ; 2 — тетраэфир пирофосфата (II); 3 —  $(\text{Tr})\text{T}(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{pT}(\text{As})$

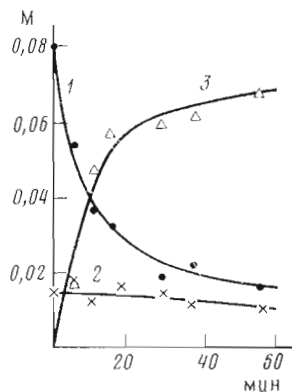


Рис. 4

Рис. 4. Кинетические кривые реакции 0,081 М тетразолида дифенилфосфорной кислоты и 0,012 М тетрафенилпирофосфата с 0,1 М тритилтимидином в диоксане при 30° С: 1 — тетразолид дифенилфосфорной кислоты (IVб); 2 — тетрафенилпирофосфат; 3 —  $(\text{Tr})\text{Tp}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$

ионной смеси убывает тетразолид (IVб) и накапливается фосфотриэфир  $(\text{Tr})\text{Tp}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ , концентрация же тетрафенилпирофосфата остается практически постоянной (рис. 4). Следовательно, тетразолид фосфодиэфира способен реагировать с нуклеозидом в отсутствие пиридина. Добавление же к реакционной смеси 2 экв. пиридина приводит к быстрому (менее 10 мин) исчезновению сигналов исходных веществ и образованию триэфира (88%) и дифенилфосфорной кислоты. Скорее всего, пиридин ускоряет стадию (4) по механизму общего основного катализа, как акцептор протона оксигруппы нуклеозида. В соответствии с этим предположением при добавлении к этой же реакционной смеси 2 экв. триэтиламина при первой же записи спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР присутствуют только сигналы триэфира (87%) и дифенилфосфорной кислоты.

Из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что на разных стадиях образования фосфотриэфира при использовании арилсульфотетразолидов пиридин выступает или в роли нуклеофильного катализатора (стадия (1), схема 1), или как основной катализатор (схема 2).

### Экспериментальная часть

В работе использованы 5'-О-тритилтимидин [9], триизопропилбензолсульfoxлорид [10], *n*-толуолсульфотетразолид [3],  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)\text{pT}(\text{As})$ , тетразолид дифенилфосфорной кислоты [1], бензо[*b*]-1,4-диазабидикло[2,2,2]октен [7], триэтиламин (х.ч., перегнанный над KOH и  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), пиридин, содержащий не более 0,05% воды (хранили над молекулярными ситами типа 4 Å),  $\gamma$ -пиколлин (перегнанный последовательно над триизопропилбензолсульfoxлоридом, KOH и  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

В качестве растворителей использовали хлористый метилен, перегнанный над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , и диоксан, перегнанный над натрием. Все кинетические измерения проводили методом спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в ампулах диаметром 10 мм (см. таблицу). Детали эксперимента приведены в работе [6].

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Silufol» в системе — хлороформ — этанол, 9 : 1 (A). Для хроматографии использовали бумагу FN-1 и системы растворителей этанол — 1 М ацетат аммония

(рН 7,5), 5 : 2 (В); изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (В); изопропанол — конц. HCl — вода, 170 : 41 : 39 (Г).

Хроматографию на колонках проводили на силикагеле KCl, фракция 0,140—0,315 мм из опытного химцеха НИОХ, микроколоночную хроматографию — на DE-41 (Whatman) в градиенте концентраций фосфатного буфера, рН 7,5, от 0 до 0,02 М.

Образующийся в реакциях триэфир (Tr)T(ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)pT(Ac) выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентраций этанола от 0 до 10% в хлороформе. Фракции, содержащие продукт (в системе А R, 0,8), собирали и упаривали. После удаления всех защитных групп по методикам работ [11, 12] продукт идентифицировали с помощью микроколоночной и бумажной хроматографии в системах Б, В и Г, сравнивая его хроматографическую подвижность с контрольным образцом.

Авторы благодарят А. В. Лебедева за снятие спектров <sup>31</sup>P-ЯМР.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Халимская Л. М., Ярмолинская Е. В. Исследование механизма химического синтеза олигонуклеотидов. XIV. Промежуточные реакции при образовании фосфотриэфиров в присутствии арилсульфохлоридов и арилсульфотетразолидов.— Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 1980, вып. 6, № 14, с. 78—86.
2. Грайфер Д. М., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Резвухин А. И. Структура активного фосфорилирующего производного фосфомоноэфиров по данным ЯМР <sup>31</sup>P и <sup>1</sup>H.— Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 3, с. 616—619.
3. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Arylsulfonyltetrazoles as highly efficient condensing reagents for polynucleotide synthesis.— Can. J. Chem., 1976, v. 54, № 4, p. 670—672.
4. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvements in the triester method for the synthesis of deoxyribonucleotides.— Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
5. Добрынин В. М., Коробко В. Г., Северцова Н. В., Болдырева Е. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Синтез структурного гена брадикинина.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 776—778.
6. Дроздова Л. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Сравнение скоростей образования межнуклеотидной связи при использовании *n*-хлорфениловых эфиров нуклеозид-3'- и 5'-фосфатов в химическом синтезе динуклеозидфосфатов триэфирным методом.— Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 1981, вып. 1, № 2, с. 125—130.
7. Шишкин Г. В., Галль А. А. Диазбициклоалканы с атомами азота в узловых положениях. 3. О гетероциклической системе бензо[*b*]-1,4-диазбицикло[2,2,2]октена.— Химия гетероцикл. соед., 1980, № 6, с. 827—830.
8. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кюорре Д. Г., Лебедев А. В., Резвухин А. И., Ярмолинская Е. В. *N*-(дифенилфосфорил)-*n*-*N'*, *N'*-диметиламинопиридиний — активное фосфорилирующее производное дифенилфосфорной кислоты.— Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 5, с. 1124—1127.
9. Gilham P. T., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. I. A new and general method for the chemical synthesis of the C<sub>5'</sub>—C<sub>3'</sub> internucleotidic linkage. Synthesis of deoxyribo-dinucleotides.— J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 23, p. 6212—6222.
10. Lohrmann R., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. LII. The use of 2, 4, 6-trisopropylbenzenesulfonyl chloride for the synthesis of internucleotide bonds.— J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 4, p. 829—833.
11. Michelson A. M., Todd A. R. Nucleotides. Part XX. Mononucleotides derived from thymidine. Identity of thymidylic acid from natural sources with thymidine-5' phosphate.— J. Chem. Soc., 1953, № 3, p. 951—956.
12. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. The use of arylsulfonyltriazoles for the synthesis of oligonucleotides by the triester approach.— J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 25, p. 7332—7337.

Поступила в редакцию  
2.X.1980

MECHANISTIC STUDIES OF CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES.  
XV. PYRIDINE ROLE IN THE PHOSPHOTRIESTER METHOD OF CHEMICAL  
SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES

ZARYTOVA V. F., SHISHKIN G. V., KHALYMSKAYA L. M.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Novosibirsk State University,  
Novosibirsk*

The role of pyridine was studied in the internucleotide bond formation by the phosphotriester method of oligonucleotide chemical synthesis in the presence of *p*-toluenesulphonyl tetrazolide (TSTetr) and triisopropylbenzenesulfonyl chloride (TPS). It was shown that pyridine is a nucleophilic catalyst of the reaction of  $(ClC_6H_4)_pT(Ac)$  with *p*-toluenesulphonyl tetrazolide leading to pyrophosphate tetraester (II) formation. The reaction of (II) with nucleoside (Tr)T also requires nucleophilic catalyst. Pyridine or its derivatives play the role of nucleophilic catalyst in the absence of tetrazole. Tetrazole is the nucleophilic catalyst for the interaction of (II) with the nucleoside when arylsulphonyl tetrazolides are used, and pyridine plays the role of a general base catalyst accepting the proton from tetrazole. It was found that diphenylphosphoryltetrazole – the analog of the proposed intermediate in the tetrazole-catalyzed pyrophosphate (II) reaction with nucleoside – reacts with (Tr)T in the absence of pyridine, however pyridine accelerates this process, probably by the mechanism of base catalysis.

---