



УДК 547.963.52.07

**ПРИМЕНЕНИЕ ТРИИЗОПРОПИЛБЕНЗОЛСУЛЬФОХЛОРИДА  
И N-МЕТИЛИМИДАЗОЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ  
ФОСФОТРИЭФИРНОЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ***Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

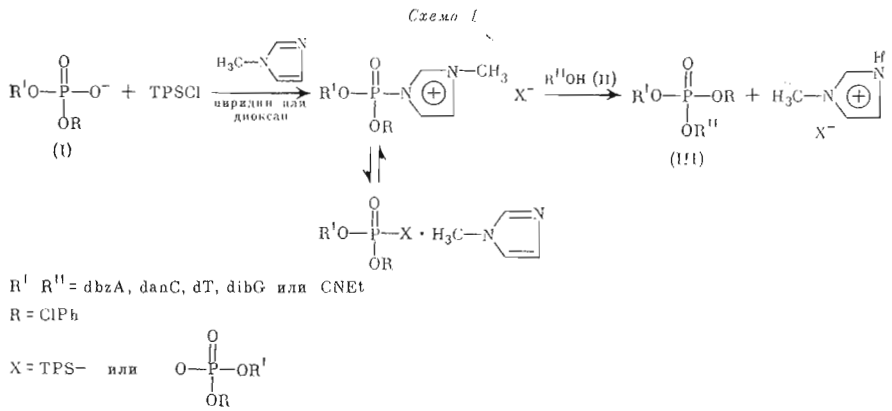
Показано, что триизопропилбензолсульфохлорид в присутствии N-метилимидазола является высокоэффективным конденсирующим реагентом в синтезе олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом. С помощью этого реагента с высокими выходами был получен ряд олигонуклеотидов длиной от 10 до 16 мононуклеотидных звеньев каждый.

В последнее время при химическом синтезе олигонуклеотидов, необходимых для проведения различных молекулярно-биологических исследований, наиболее широко применяется триэфирный подход [1]. Один из вариантов этого подхода включает в себя активацию фосфодиэфирной группировки нуклеотидного компонента подходящим конденсирующим реагентом и последующее фосфорилирование гидроксильной группы нуклеозидного компонента с образованием фосфотриэфирной связи. В качестве конденсирующих реагентов при этом чаще всего используются арилсульфоазолиды: 4-нитроимидазолиды, 1,2,4-триазолиды, 3-нитро-1,2,4-триазолиды и тетразолиды [2–5]. В то же время хорошо зарекомендовавшие себя в диэфирном методе синтеза олигонуклеотидов арилсульфохлориды оказались неэффективными в триэфирном варианте из-за медленного протекания реакции и низкого выхода целевого продукта [2]. В ходе наших исследований по синтезу олиго- и полинуклеотидов было обнаружено, что в присутствии N-метилимидазола арилсульфохлориды являются не менее эффективными конденсирующими реагентами для создания фосфотриэфирной связи, чем самые активные из арилсульфоазолидов — арилсульфотетразолиды.

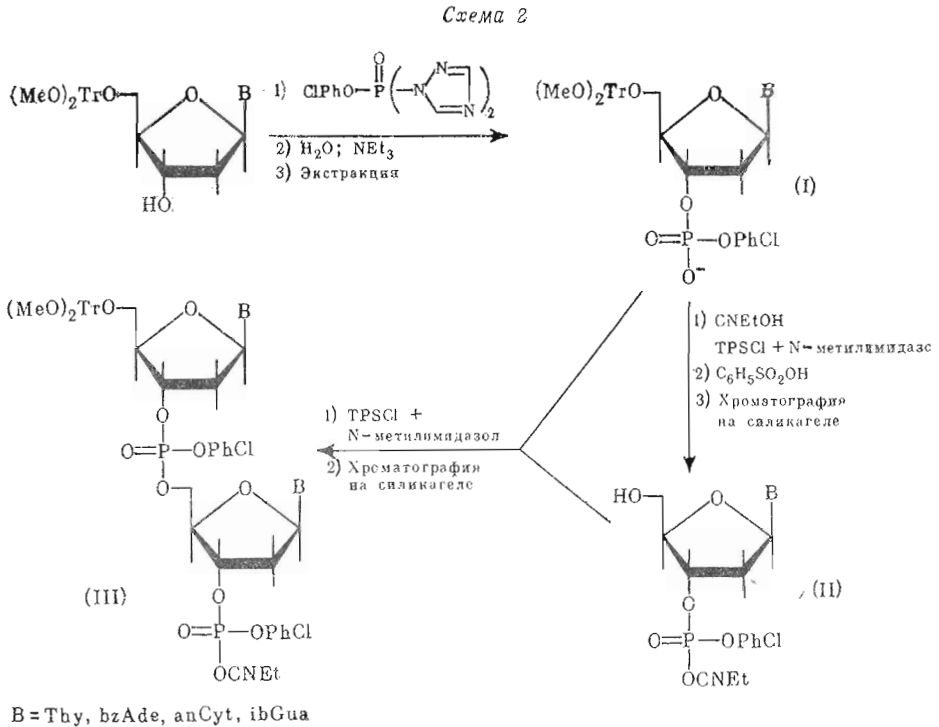
Ранее было показано, что такие соединения, как N-метилимидазол и 4-N,N-диметиламинопиридин, представляют собой эффективные катализаторы реакций фосфорилирования [6–8]. Их применяют при синтезе олигонуклеотидов без конденсирующих реагентов при использовании бифункциональных фосфорилирующих средств типа арилдихлорфосфатов и арилфосфодитриазолидов для ускорения протекания реакций образования фосфотриэфирной связи. Аналогично этому при прибавлении в реакционную смесь, содержащую фосфодиэфирный (I) и гидроксильный (II) компоненты реакции в пиридине или диоксане, наряду с TPS-хлоридом 2–3 эквивалентов N-метилимидазола протекание реакции образования фосфотриэфира (III) заметно ускоряется (см. схему 1).

Ранее мы описывали получение 3'-n-хлорфенил-β-цианэтилфосфатов нуклеозидов из соответствующих n-хлорфениловых эфиров нуклеотидов действием избытка β-цианэтанола в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида [9]. Прибавление в реакционную смесь N-метилимидазола сокращает время, необходимое для завершения реакции, с 1,5–2 ч до 5–10 мин, причем выходы фосфотриэфиров приближаются при этом к

Использованы следующие нестандартные обозначения: MIm — N-метилимидазол; TPSCl (TPS-хлорид), TPST (TPS-тетразолид — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид и -тетразолид соответственно); MSCl — метилсульфохлорид; ib — изобутирил. Символом  $\ddagger$  обозначена межнуклеотидная связь, защищенная n-хлорфенильным остатком.



количественным. При проведении межнуклеотидных конденсаций с использованием в качестве конденсирующего реагента TPS-хлорида в присутствии N-метилимидазола (схема 2) реакция образования фосфотриэфирной связи практически завершается за 20–30 мин, а выходы динуклеотидов варьируют от 75 до 95%. В отсутствие нуклеофильного катализатора за то же время образование динуклеотида под действием TPS-хлорида проходит только на 10–15%, а за 2 ч — не более чем на 25% (табл. 1).



При получении олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом одним из побочных процессов, заметно снижающим выход целевого продукта, является сульфонилирование 5'-гидроксильной группы нуклеозидного компонента. Сравнение степени сульфонилирования в присутствии TPS-тетразолида и смеси TPS-хлорида с N-метилимидазолом показало, что в отсутствие фосфатного компонента за 2 ч выход продукта сульфонилирования 5'-ОН-группы нуклеозидного компонента в первом случае составил ~20%, а во втором ~15%. В такой же степени сульфонилирование протекает при использовании смеси TPS-хлорид+тетразол [10]\*. В обычных условиях

\* С помощью ТСХ на силикагеле нами было обнаружено, что при взаимодействии TPS-хлорида и тетразола (мольное соотношение 1:3) в сухом пиридине с выходом 10–20% образуется TPS-тетразолид (ср. [10]).

Получение динуклеотида  $d[(MeO_2)Tr]T\equiv Tr(CNEt, ClPh)$  с помощью различных конденсирующих реагентов \*

Конденсирующий реагент **	Время реакции, мин	Выход динуклеотида, % ***	Выход продукта сульфонилирования, % ***	Цианэтилирование, %
TPSCl	30	10–15	—	—
TPSCl	120	25	5	—
TPST	60	80	5	1
TPSCl + тетразол, 1 : 3	40	85	3–5	1
TPSCl+MIm, 1 : 3	30	95	2–3	1
TPSCl + диметиламинопиридин, 1 : 3	30	50	10	40
MSCl+MIm, 1 : 3	30	90	5–6	1

\* Мезонуклеотидные конденсации проводили при соотношении  $d[(MeO_2)Tr]Tr(ClPh) - dTr(CNEt, ClPh)$  1,2 : 1. Продукты реакции выделяли ТСХ на силикагеле, элюировали хлороформом, содержащим 10% метанола, и их количества определяли спектрофотометрически.

\*\* Использовался 2-кратный избыток конденсирующего реагента относительно нуклеотидного компонента.

\*\*\* В расчете на нуклеозидный компонент.

межнуклеотидной конденсации в присутствии небольшого избытка фосфатного компонента сульфонилирование смесью TPS-хлорид+метилмидазол составляет не более 2–3%. При использовании в качестве конденсирующего реагента смеси мезитилсульфохлаорида и N-метилмидазола выход продукта сульфонилирования возрастал, а скорость основной реакции заметно не увеличивалась (см. табл. 1).

Замена N-метилмидазола на 4-N,N-диметиламинопиридин давала хорошие результаты при получении олигонуклеотидов, имеющих на 3'-конце ацилированный гидроксил. В случае же применения в качестве нуклеозидного компонента реакции моно- или олигонуклеотида с 3'-фосфатом, блокированным  $\beta$ -цианэтильной группой, в процессе конденсации под действием диметиламинопиридина наблюдалось частичное удаление цианэтильной группы (до 40%). Кроме того, значительно возрастал процент сульфонилирования 5'-ОН-группировки нуклеозидного компонента.

С использованием в качестве конденсирующего реагента смеси TPS-хлорида и N-метилмидазола нами было получено более 15 олигонуклеотидов длиной от 10 до 16 мононуклеотидных звеньев каждый. В табл. 2 приведены выходы некоторых защищенных олигомеров, синтезированных этим способом, в частности декадезоксирибонуклеотида  $d(A-G-C-T-T-G-G-A-T-C)$ , додекадезоксирибонуклеотида  $d(C-C-C-G-G-G-G-C-C-G-G)$  и гексадекадезоксирибонуклеотида  $d(T-G-C-A-G-A-A-G-C-G-T-G-G-C-A-T)$ . При проведении межнуклеотидных конденсаций обычно использовали небольшой избыток фосфодиэфира (I) относительно нуклеозидного компонента (II) и соответственно 2- и 4-6-кратный избытки TPS-хлорида и метилмидазола относительно нуклеотидного компонента (I).

Применение метилмидазола, способного связывать выделяющиеся в процессе реакции триизопропилбензолсульфокислоту и HCl, позволило исключить стадию экстракции хлороформного раствора реакционной смеси водным бикарбонатом натрия, необходимую как при работе с TPS-тетразолидом, так и со смесью TPS-хлорида и тетразола [10]. Для выделения полностью блокированных олигонуклеотидов использовали хроматографию на силикагеле. После удаления защитных групп конечные соединения очищали ионообменной хроматографией, причем до 60% УФ-поглощающего материала представляло собой целевой продукт (рис. 1). Для выделения олигонуклеотидов с длиной цепи более 12 мононуклеотидных звеньев помимо ионообменной хроматографии применяли также препаративный электрофорез в полиакриламидном геле. Этот метод оказался наиболее полезным при очистке 16-звенных олигонуклеотидов. Гомогенность полученных соединений подтверждали хроматографией высокого разрешения в режиме обращенной фазы на колонке «Zorbax C-8» (рис. 2), а их структуру — частичным гидролизом 5'- $^{32}P$ -меченных препаратов олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного ядра с последующим фингерпринтированием [11].



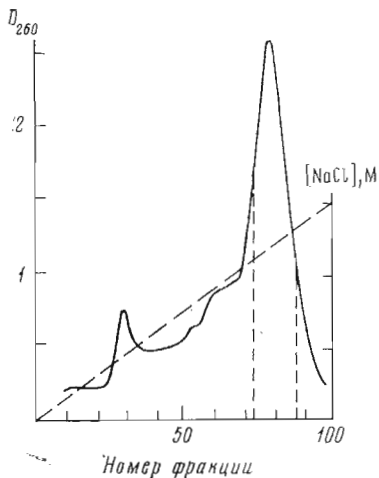


Рис. 1. Выделение додекануклеотида  $d(C-C-C-G-G-G-G-C-C-G-G)$  на DEAE-целлюлозе ( $Cl^-$ ) в градиенте концентрации  $NaCl$  в 7 М мочевины, содержащей 0,01 М трис- $HCl$  ( $pH$  7,5). Колонка  $1 \times 25$  см, фракции по 5 мл за 5 мин. Центральная часть основного пика содержит 170  $OE_{260}$  додекануклеотида

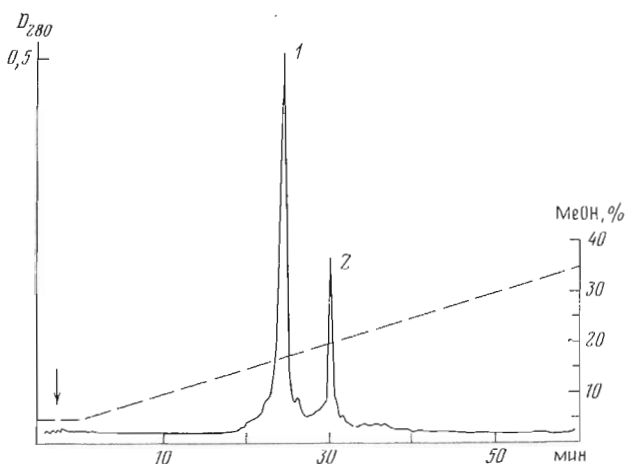


Рис. 2. Проверка гомогенности гексадекануклеотида  $d(T-G-C-A-G-A-A-G-C-G-T-G-G-C-A-T)$  обращенно-фазовой хроматографией на колонке с Zorbax C-8 ( $4 \times 250$  мм) в градиенте концентрации метанола в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин: 1 — немодифицированный гексадекануклеотид; 2 — тот же олигонуклеотид, содержащий модификации гетероциклических оснований

Использование в олигонуклеотидном синтезе TPS-хлорида в сочетании с N-метилимидазолом имеет ряд преимуществ перед применением других конденсирующих реагентов, в частности TPS-тетразолидом. Во-первых, реакции межнуклеотидных конденсаций под действием TPS-хлорида и N-метилимидазола протекают с большей скоростью, чем с TPS-тетразолидом. В то же время как TPS-хлорид, так и метилимидазол являются коммерчески доступными препаратами и могут храниться при комнатной температуре длительное время, тогда как арилсульфопроизводные тетразола нестабильны и хранятся не более 1 месяца при  $0^\circ C$ , и их необходимо готовить *цезадо* до использования.

Во-вторых, применение смеси этих реагентов позволяет исключить из процесса обработки реакционной смеси стадию экстракции, что значительно сокращает время, затрачиваемое на выделение каждого олигонуклеотида.

В-третьих, как показали наши эксперименты, выходы олигонуклеотидов, полученных с помощью TPS-хлорида и N-метилимидазола, в среднем выше, чем выходы олигомеров, синтезированных с помощью TPS-тетразолида, а целевой продукт менее модифицирован и не требует

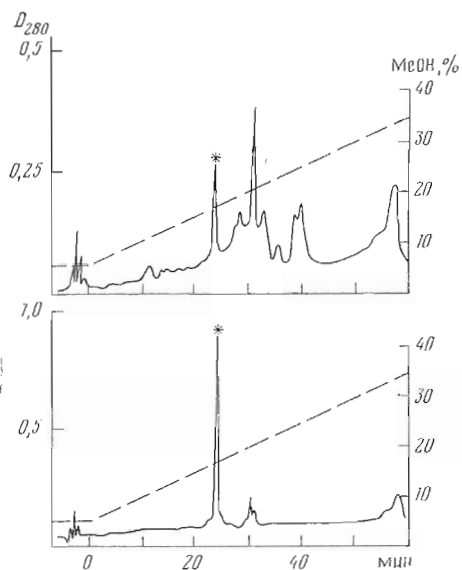


Рис. 3. Проверка гомогенности гексадекануклеотида d(G-T-T-C-G-A-C-A-A-T-G-C-C-A-C-G) (пик отмечен звездочкой), синтезированного с использованием TPSCI+тетразол (а) и смеси TPSC-хлорида и N-метилимидазола (б) в качестве конденсирующих реагентов, обращенно-фазовой хроматографией на колонке Zorbax C-8 (4×250 мм) в градиенте концентрации метанола в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин. Олигонуклеотид после удаления защитных групп очищали анионообменной хроматографией, а затем электрофорезом в полиакриламидном геле (см. «Эксперимент. часть»)

интенсивной очистки. Последнее особенно заметно при получении олигонуклеотидов с длиной цепи более 10 мононуклеотидных звеньев, а также олигомеров, содержащих в своем составе большое количество остатков гуанозина (рис. 3).

### Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды (Sigma, США), 1-N-тетразол, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, 4,4'-диметокситриэтилхлорид, 1,2,4-триазол (Aldrich, Бельгия), N-метилимидазол, 4-N,N-диметиламинопиридин, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (Merck, ФРГ), силикагельные пластинки для ТСХ «Silufol UV<sub>254</sub>» (Kavalier, СССР), силикагель для колоночной хроматографии L 40/100 (Chemapol, ЧССР).

Защитные нуклеозиды синтезировали как описано в работе [12]. ТСХ на силикагеле проводили в системе хлороформ — метанол (9:1). Защитные группы с целевых олигонуклеотидов удаляли последовательной обработкой смесью конц. NH<sub>3</sub> — диоксан, 1:2, в течение 1 сут, конц. NH<sub>3</sub> (3 сут при 20° С) и 80% уксусной кислотой (15 мин при 20° С).

5'-<sup>32</sup>P-меченные препараты олигонуклеотидов получали с помощью [γ-<sup>32</sup>P]АТР (Amersham, Англия) и T4-полинуклеотидкиназы (P-L Biochem, США), как было описано ранее [13]. Структуру <sup>32</sup>P-меченных олигонуклеотидов подтверждали фингерпринтированием по методу [11].

Обращенно-фазовую хроматографию под высоким давлением осуществляли на приборе «Du Pont Preparative HPLC System 830» (США) на колонке «Zorbax C-8» размером 4×25 см (см. рис. 2).

**Синтез защищенных мононуклеотидов (схема 2).** а) *n*-Хлорфениловые эфиры нуклеотидов. *n*-Хлорфенилфосфодитриазолид получали взаимодействием 10 ммоль *n*-хлорфенилдихлорфосфата с 20 ммоль 1,2,4-триазола в 50 мл сухого диоксана в присутствии 20 ммоль триэтиламина в течение 0,5–1 ч при перемешивании и охлаждении до 0° С. Осадок хлоридрата триэтиламина отфильтровывали, полученный раствор прибавляли к 5 ммоль 5'-О-диметокситриэтилнуклеозида, предварительно высушенного упариванием с сухим пиридином. Реакционную смесь концентрировали в вакууме до половины объема и выдерживали 40–60 мин при ~20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ на силикагеле. Затем прибавляли 15 ммоль триэтиламина и 60 ммоль воды. Полученную смесь упаривали, остаток растворяли в 200 мл хлороформа и промывали 0,1 М бикарбонатом триэтиламония (3×200 мл). Хлороформный раствор упаривали в вакууме.

б) *5'-О-Диметокситритил-3'-п-хлорфенил-β-цианэтилфосфаты нуклеозидов*. 5 ммоль *n*-хлорфенилового эфира нуклеотида и 10 ммоль β-цианэтанола высушивали отгонкой с сухим пиридином, затем прибавляли 10 моль TPS-хлорида и 20 ммоль *N*-метилимидазола. Через 10 мин прибавляли избыток воды и реакционную смесь упаривали.

в) *n-Хлорфенил-β-цианэтилфосфаты нуклеозидов*. 5'-О-Диметокситритил-3'-п-хлорфенил-β-цианэтилфосфат нуклеотида высушивали отгонкой с толуолом, растворяли в 2% растворе бензолсульфокислоты в смеси хлороформ — метанол (7 : 3, 10 мл на 1 ммоль триэфира) и выдерживали 2–5 мин при 0° С. Затем прибавляли равный объем хлороформа и полученный раствор экстрагировали 5% водным NaHCO<sub>3</sub> до прекращения выделения CO<sub>2</sub>. Хлороформный слой отделяли, упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и осаждали смесью эфир — гексан (1 : 1). Осадок отделяли центрифугированием и высушивали в вакууме. Полноту прохождения всех реакций контролировали с помощью ТСХ на силикагеле.

*Межнуклеотидные конденсации* (схемы 1, 2). Нуклеотидный (I) и нуклеозидный (II) компоненты реакции (1 и 1,2–1,5 ммоль соответственно) предварительно высушивали упариванием с сухим пиридином, затем растворяли в сухом пиридине или диоксане (10 мл на 1 ммоль нуклеотидного материала) и прибавляли 2,0–3,0 ммоль TPS-хлорида и 5,0–9,0 ммоль метилимидазола. Через 30–40 мин реакцию останавливали добавлением избытка воды. Затем прибавляли равный объем толуола и реакционную смесь упаривали досуха. Остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем (50 мл силикагеля на 1 ммоль). Защищенные олигонуклеотиды элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0–5% метанола). Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и упаривали. Остаток растворяли в хлороформе и осаждали петролейным эфиром (на 1 объем хлороформа 10 объемов эфира). Осадок отделяли центрифугированием и высушивали в вакууме. Удаление диметокситритильной и β-цианэтильной защитных групп с полностью защищенных олигонуклеотидов перед очередной конденсацией проводили как описано в работах [3, 14].

*Выделение олигонуклеотидов после удаления защитных групп* проводили анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, как показано на рис. 1 (см. также [13]). Олигонуклеотиды с длиной цепи более 12 мононуклеотидных звеньев дополнительно очищали препаративным электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Электрофорез осуществляли в вертикальных пластинах геля (0,3×20×20 см), в качестве электродного буфера использовали 0,05 М трис-борат (рН 8,3), содержащий 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту. Для выделения олигонуклеотидов с полиакриламидного геля с пластины геля удаляли оба стекла, накладывали ее на пластинку «Silufol UV<sub>251</sub>», зоны, содержащие олигонуклеотиды, обнаруживали с помощью УФ-света и вырезали. Вырезанные кусочки полиакриламидного геля тщательно измельчали до пасты и заливали на несколько часов 0,25 М бикарбонатом триэтиламиния (рН 8,0). Затем полученную кашцеобразную смесь переносили в небольшую колонку, нуклеотидный материал элюировали тем же буфером (два объема геля). Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в 0,5 мл воды и олигонуклеотид обессоливали на колонке с сефадексом G-50 (1,5×30 см). Возврат олигонуклеотидов с полиакриламидного геля составлял при этом в среднем 70–80%. На 5 см<sup>2</sup> поверхности нанесения полиакриламидного геля без ухудшения разделения можно помещать до 100 ОЕ<sub>260</sub> нуклеотидного материала, т. е. до 50 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида в лунку геля размером 0,3×8 см.

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и помощь при выполнении данной работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Crea R., Hirose T., Itakura K.* Tetrahedron Lett., 1979, № 5, p. 395–398.
2. *Katagiri N., Itakura K., Narang S. A.* J. C. S. Chem. Commun., 1974, № 10, p. 325–326.
3. *Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
4. *Reese C. B., Titmas R. C., Yan L.* Tetrahedron Lett., 1978, № 30, p. 2727–2730.
5. *Gough G. R., Singleton C. K., Weith H. L., Gilham P. T.* Nucleic Acids Res., 1979, v. 6, № 4, p. 1557–1570.
6. *van Boom J. H., Burgess P. M. J., Crea R., Luyten W. C. M. M., Vink A. B. J., Reese C. B.* Tetrahedron, 1975, v. 31, № 23, p. 2953–2959.
7. *Cashion P., Porter K., Cadger T., Sathe G., Tranquilla T., Nolman H., Jay E.* Tetrahedron Lett., 1976, № 42, p. 3769–3772.
8. *Broka C., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K.* Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5461–5471.
9. *Chakhmakhcheva O. G., Efimov V. A., Ovchinnikov Yu. A.* Nucleic Acids Res., 1980, Symp. Ser. № 7, p. 345–363.
10. *Seth C., Jay E.* Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5445–5459.
11. *Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R.* Nucleic Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331–353.
12. *Schaller H., Weimann S., Lerch B., Khorana H. G.* J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 3821–3827.
13. *Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1329–1340.
14. *Hsiung H. M., Brousseau R., Michnicwicz J., Narang S. A.* Nucleic Acids Res., 1979, v. 6, № 4, p. 1371–1385.

Поступила в редакцию  
7.IX.1981

### USE OF TRIISOPROPYLBENZENESULFONYL CHLORIDE AND N-METHYLIMIDAZOLE IN THE PHOSPHOTRIESTER INTERNUCLEOTIDE BOND FORMATION

EFIMOV V. A., REVERDATTO S. V., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

It was found that arylsulfonyl chlorides in the presence of N-methylimidazole are effective coupling reagents for the phosphotriester bond formation. Using TPSCl (triisopropylbenzenesulfonyl chloride) and N-methylimidazole as a condensing reagent, a set of oligonucleotides of chain length between 10–16 nucleotides has been synthesized. The coupling reactions utilizing this reagent proceed faster and in higher yields than those with TPSTe (triisopropylbenzenesulfonyl tetrazolide). In addition, the desired oligomers are less contaminated with by-products — in particular 5'-O-sulfonylated compounds and oligonucleotides modified at guanine bases.