



УДК 547.963.32.07:542.953.2

УДАЛЕНИЕ О-ЗАЩИТНЫХ ТРИТИЛЬНЫХ ГРУПП В СИНТЕЗЕ  
ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ  
ФАКТОРОВ И УСЛОВИЙ АЦИДОЛИЗА НА СКОРОСТЬ  
ДЕТРИТИЛИРОВАНИЯ И ДЕПУРИНИЗАЦИИ \*

Буткус В. В., Каюшин А. Л., Берлин Ю. А.,  
Колосов М. Н.

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

*Смирнов И. В.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Изучено влияние структурных факторов и условий реакции на скорость детритилирования и депуринизации дезоксирибонуклеозидов и нуклеотидов при действии BSA, ZnBr<sub>2</sub>, TFA, TCA, DCA и некоторых других кислот. Найдено, что среди исследованных реагентов наиболее селективным является TFA в дихлорэтаноле, при применении которого отщепление 5'-диметокситритильной группы в наименьшей степени сопровождается депуринизацией. Результаты этой работы в сочетании с ранее полученными данными о влиянии растворителя на скорость межнуклеотидной конденсации показывают, что дихлорэтан пригоден в качестве единого растворителя для синтеза олигонуклеотидов фосфотриэфирным методом.

Тритильные группы широко применяются в органическом синтезе для защиты спиртовых гидроксильных групп в полиоксисоединениях. Незамещенная тритильная группа часто используется в химии углеводов, но мало пригодна в случае нуклеотидов, так как для ее удаления требуется довольно жесткая кислотная обработка, при которой пуриновые дезоксирибонуклеотиды расщепляются по N-гликозидной связи (реакция депуринизации). Поэтому в качестве 5'-защитных групп для дезоксирибонуклеотидов были предложены MMTr- и DMTr-группы [1], ацидолиз которых облегчается благодаря повышенной резонансной стабилизации образующегося тритильного катиона. Первая из этих двух групп хорошо зарекомендовала себя в фосфодиэфирном методе [2], где она сохраняется на протяжении всего синтеза и удаляется лишь на заключительной стадии, после N-деблокирования конечного полностью защищенного олигонуклеотида. Однако для синтеза фосфотриэфирным путем [3] MMTr-группа практически непригодна, так как деблокирование 5'-гидроксила при этом проводится на каждом этапе наращивания нуклеотидной цепи, а N-ацилированные дезоксирибонуклеотиды (в первую очередь адениновые) проявляют повышенную склонность к депуринизации [4, 5]. По этой причине в усовершенствованном фосфотриэфирном методе применяется более легко отщепляемая DMTr-группа, и ее удаление осуществляется кратковременным действием BSA при 0°С [6].

В последние годы проблема детритилирования приобрела особое значение в связи с разработкой эффективных методов автоматизированного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на полимерных носителях. Для макси-

\* Посвящается памяти академика М. М. Шемякина (1908—1970 гг.) в связи с 75-летием со дня рождения. В статье использованы следующие нестандартные сокращения: BSA — бензолсульфокислота, ClPh — *n*-хлорфенил, DCA — дихлоруксусная кислота, DMTr — 4,4'-диметокситритил, DNbz — 3,5-динитробензил, MSA — монохлоруксусная кислота, MMTr — 4-монометокситритил, TCA — трихлоруксусная кислота, TFA — трифторуксусная кислота. Символом  $\#$  обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком. В формулах (и названиях) нуклеозидов и нуклеотидов префикс «d» (дезокс) ради краткости опущен. TMU — тетраметилмо-  
чевина.

мального увеличения числа последовательных циклов наращивания нуклеотидной цепи, т. е. для синтеза возможно более длинных олигонуклеотидов, необходимо обеспечить на каждом этапе быстрое и полное деблокирование 5'-гидроксила, одновременно свести к минимуму побочную реакцию депуринизации. Применение для этой цели триметокситритильной группы, которая отщепляется еще легче, чем DMTr-группа [7], малопривлекательно из-за практической трудности получения в чистом виде кислотолабильных исходных веществ для такого синтеза. Поэтому усилия многих исследователей были направлены на поиски более специфических средств отщепления DMTr-группы, и в результате было разработано несколько новых способов детритилирования нуклеотидов.

В 1980 г. Маттеуччи и Карузерс и независимо от них Кэстер с сотр. предложили использовать в качестве детритилирующего реагента  $ZnBr_2$  в безводном нитрометане [8] или в хлористом метиле с добавкой метанола [9]. Одновременно Гейт и др. [10] сообщили, что эффективным реагентом для удаления 5'-DMTr-группы является 10% TCA, впервые использованная для этой цели С. Г. Поновым (цит. по [11]). Однако впоследствии было обнаружено, что при применении  $ZnBr_2$  в безводном нитрометане получаются невоспроизводимые результаты [12], а в хлористом метиле с метанолом происходит алкоголиз N-защитных ацильных групп [13], в связи с чем было предложено проводить реакцию в нитрометане, содержащем 1% воды [12], или в смеси хлористый метилен — изопропанол, 85:15 [13]. В более поздних сообщениях отмечалось также, что при отщеплении 5'-DMTr-группы под действием  $ZnBr_2$  в апротонном растворителе образуются цинкаты (для разложения которых рекомендуется обработка *n*-бутанолом в присутствии лутидина [14]) и что  $ZnBr_2$  неэффективен при деблокировании 5'-DMTr-нуклеотидов, иммобилизованных на полимерах акриламидного типа [15], хотя дает прекрасные результаты при твердофазном синтезе фосфитным и фосфоритриэфирным методами на силикагеле и полистироле (см., например, [12, 15, 16]). Что касается TCA, то ее действие на 5'-DMTr-нуклеотиды изучалось в растворе и на полимерных носителях, полученных на основе полиакрилморфолида и силикагеля [11, 15, 17]. По данным одной группы исследователей [11] этот реагент за время полного детритилирования вызывает лишь незначительное отщепление бензоилденина от соответствующего защищенного дезокси-нуклеотида, но согласно недавней публикации другой группы [17] степень депуринизации при действии TCA весьма существенна, вследствие чего авторы предпочли вернуться к 3% BSA, хотя и в новых условиях (в смеси хлористый метилен — диметилформамид, 9:1).

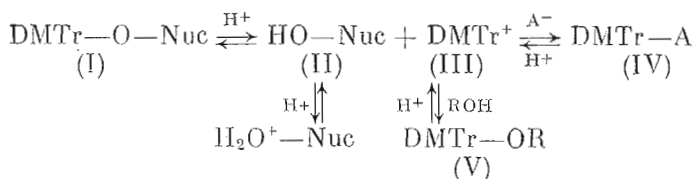
В цитированных выше работах содержатся важные сведения о скорости реакций детритилирования и депуринизации под действием BSA, TCA и  $ZnBr_2$ , но, к сожалению, сравнительный анализ этих данных затруднен двумя обстоятельствами. Во-первых, различные авторы использовали разные реагенты в неодинаковых условиях, а иногда и с разными субстратами. Например, в работе [18] измерена скорость детритилирования и депуринизации (DMTr)bzA и (DMTr)bzAp(ClPh)(CNEt) под действием 2% BSA при 0°С и 1% BSA при комнатной температуре, тогда как в статье [8] сопоставлены результаты, полученные на первом из этих субстратов с насыщенным раствором  $ZnBr_2$  в нитрометане при 0 и 18°С, с одной стороны, и с 2% TsOH при 18°С и 0,5% TSOH при 0°С — с другой, а в третьей статье [11] сравнивали депуринизацию и детритилирование второго из указанных субстратов под действием 10% TCA и 5% BSA при комнатной температуре, т. е. в условиях, отличающихся от использованных в предыдущих исследованиях.

Во-вторых, почти во всех опубликованных до сих пор работах скорость детритилирования оценивали по времени «полного» превращения, т. е. по исчезновению исходного тритилсодержащего вещества в реакционном растворе (при гомогенной реакции) или окрашенного тритильного катиона в кислом элюате (при твердофазной реакции). Очевидно, что понятие «полное» превращение является относительным и что величина  $t_{\text{полн}}$  за-

висит не только от скорости реакции, но также от начальной концентрации исходного вещества и от чувствительности метода его определения. По нашим данным, при ТСХ на силикагеле 5'-О-диметокситритилтимидина (однократное нанесение 1 мкл анализируемого раствора) тритилсодержащее вещество обнаруживается на хроматограмме (хлорной кислотой при нагревании) уже в концентрации 10–15 мкМ, т. е. чувствительность анализа составляет 10<sup>-11</sup> моля. Отсюда следует, что, например, при начальной концентрации ДМТг-нуклеотида 0,1 М исходное вещество перестает обнаруживаться на ТСХ только после того, как детритилирование прошло больше чем на 99,99%. Между тем при любом синтезе, в том числе при твердофазном синтезе олигонуклеотидов, можно считать практически полным всякое превращение, прошедшее на ≥99%. В связи с этим представлялось вероятным, что во многих опубликованных работах время «полного» детритилирования неоправданно преувеличено и, как следствие, рекомендуемые условия не являются оптимальными.

Поэтому с целью сравнения описанных в литературе и разработки новых методов удаления О-защитных тритильных групп мы предприняли изучение кинетики реакций детритилирования и депуринизации ДМТг-производных дезокси-нуклеозидов и дезокси-нуклеотидов под действием протонных и льюисовских кислот в различных условиях. Поскольку в присутствии большого избытка кислоты оба превращения — детритилирование и отщепление пуринового остатка — должны представлять собой реакции первого порядка, селективность каждого метода оценивали по соотношению  $t_{1/2}$  депуринизации/ $t_{1/2}$  детритилирования (что равно  $k_{\text{детритил}}/k_{\text{депур}}$ ), которое показывает, во сколько раз продукт детритилирования образуется быстрее, чем разлагается. Что касается «полного» детритилирования, то при кинетике первого порядка реакция должна протекать на 99% за время, равное  $7t_{1/2}$ , и на 99,9% за время  $10t_{1/2}$ .

Прямое определение периода полудетритилирования путем хроматографического анализа реакционных смесей трудоемко, а в случае быстро протекающих реакций представляет технические трудности. Практически более удобным является другой подход, основанный на спектральном измерении концентрации отщепляющегося диметокситритильного катиона (III) ( $\lambda_{\text{макс}}$  500 нм). Следует отметить, что этот катион, обладая достаточно высокой электрофильностью, реагирует с присутствующими в среде нуклеофилами: с О-деблокированным нуклеотидом или нуклеозидом (II), анионом кислоты А<sup>-</sup> и оксисоединениями ROH — водой или спиртами, если они содержатся в реакционном растворе. Равновесие (I) ⇌ (II) + (III) сдвигается вправо благодаря протонированию нуклеозида (II) избытком кислоты; аналогичным образом положение равновесия в обратимых реакциях (V) ⇌ (III) ⇌ (IV) зависит от силы используемой кислоты (т. е. от концентрации протонов и нуклеофильности аниона А<sup>-</sup>), а также от свойств растворителя и содержания в нем воды и спиртов. (Эти соображения относятся как к протонным, так и льюисовским кислотам.) В качестве иллюстрации в табл. 1 приведены данные о влиянии кислоты и растворителя на коэффициент молярного поглощения диметокситританола при 500 нм, который прямо пропорционален равновесной концентрации катиона ДМТг<sup>+</sup> в исследуемом растворе.



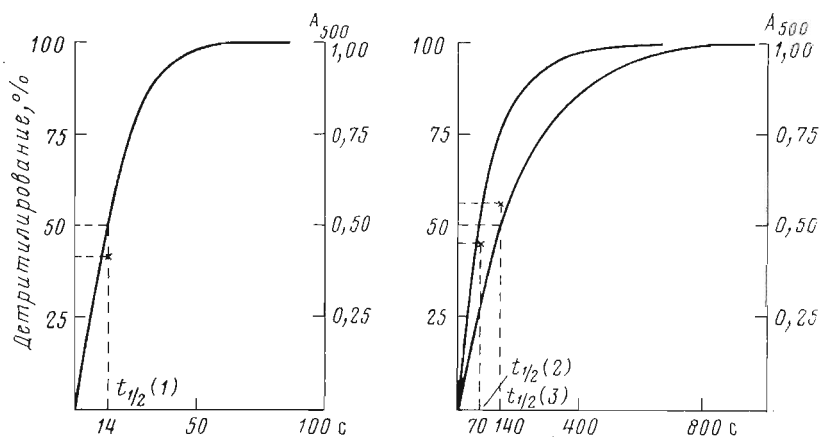
Все это усложняет определение истинной концентрации катиона (III) в реакционной среде, однако для наших целей существенно, что периоду полудетритилирования отвечает время, за которое оптическая плотность раствора в области поглощения тритильного катиона достигает половины максимального значения независимо от величины последнего и от концен-



Скорость детритилирования защищенных нуклеозидов и нуклеотидов при 20° С

№	Субстрат	$t_{1/2}$ детритилирования (с) при действии											
		0,1 М BSA в		0,1 М ТГА в		0,1 М ТСА в		0,1 М DCA в		0,1 М MCA в			
		MeCN	CHCl <sub>3</sub> -MeOH, 7 : 3	MeCN	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	MeCN	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	MeCN	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	MeCN	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>		
1	(DMTr) T	0,015	2,0	<1	0,019	2	0,054	306	7,03	67			
2	(DMTr) bzC	0,034	1,0	78	0,014	70	0,051	373	2,71	62			
3	(DMTr) bzA	0,024	0,5	26	0,019	40	0,038	420	2,51	34			
4	(DMTr) bzG	0,008	0,2	20	0,008	30	0,020	500	0,69	17			
5	T (DMTr)		11			155				7500			
6	bzC (DMTr)					280				5600			
7	bzA (DMTr)		14			150				6400			
8	bzG (DMTr)					240				6600			
9	(DMTr) Tp (ClPh) (CNEt)	0,044	6,85 (10) *			3							
10	(DMTr) bzCp (ClPh) (CNEt)	0,097	4,44 (6) *			140							
11	(DMTr) bzAp (ClPh) (CNEt)	0,057	1,92 (1) *			90							
12	(DMTr) bzGp (ClPh) (CNEt)	0,013	0,85 (1) *			60							
13	(DMTr) T≡T (Ac)					10							
14	(DMTr) T≡Tp (ClPh) (CNEt)					13							
15	(DMTr) T≡T≡T (Ac)					11							
16	(DMTr) T≡bzCp (ClPh) (CNEt)					51							
17	(DMTr) T≡bzAp (ClPh) (CNEt)					51							
18	(DMTr) T≡bzGp (ClPh) (CNEt)					55							
19	(DMTr) bzC≡bzCp (ClPh) (CNEt)					154							

\* В скобках приведено время «полного» детритилирования (мин) 2 % ( $\approx 0,13$  M) раствором BSA в смеси хлороформ — метанол (85 : 15) при 0° С по данным работы [13].



Кинетика отщепления DMTr-группы при 20° С. 1 — реакция bzA(DMTr) с 0,1 М BSA в смеси хлороформ — метанол (7:3), 2 — (DMTr)bzC с 0,1 М TCA в ацетонитриле, 3 — (DMTr)bzCp(ClPh) (CNEt) с 0,1 М TCA в ацетонитриле. Указаны величины  $t_{1/2}$ , измеренные спектрофотометрически по  $A_{500}$ , и степень детритилирования (отмечена знаком \*), найденная с помощью ТСХ в момент  $t_{1/2}$

творителей. Аналогичный, но более выраженный эффект наблюдается при переходе от нуклеозида к динуклеотиду, причем второе нуклеотидное звено замедляет реакцию тем сильнее, чем легче детритилируется 5'-концевой нуклеозид. Так, динуклеотиды с 5'-концевым остатком тимидина детритилируются значительно медленнее, чем сам тимидин или его 3'-фосфат (ср. № 1, 9, 13, 14). В роли второго звена тимидин замедляет реакцию гораздо меньше, чем остальные три нуклеозида, которые в этом отношении почти не отличаются один от другого (ср. № 14, 16—18). Таким образом, во всех случаях тимидин по своему влиянию на скорость детритилирования заметно отличается от остальных нуклеозидов. Если же 5'-концевым звеном является цитидин, который среди четырех мономеров детритилируется наиболее медленно, то переход от его 3'-фосфата к динуклеотиду вообще не замедляет реакции (ср. № 10 и 19). Существенно, что дальнейшее удлинение нуклеотидной цепи практически не сказывается на отщеплении диметокситритильной группы (ср. № 13—15).

Легкость удаления диметокситритильной группы сильно зависит также от ее положения в дезоксирибозном кольце. Детритилирование 3'-DMTr-нуклеозидов, как и следовало ожидать, протекает значительно медленнее, чем расщепление соответствующих 5'-производных (ср. № 1—4 и 5—8), причем природа гетероциклического основания почти не влияет на скорость реакции, по-видимому, из-за *транс*-расположения заместителей при C1' и C3'. Вероятно, по той же причине отщепление обеих защитных групп от 3',5'-бис-DMTr-нуклеозидов протекает независимо и кинетическая кривая реакции почти точно совпадает с суммой кривых детритилирования соответствующих 3'- и 5'-производных. Благодаря этому 3'-DMTr-нуклеозиды могут быть легко получены отщеплением 5'-DMTr-группы от 3',5'-биспроизводных, причем селективность 5'-детритилирования возрастает в том же ряду, что и скорость этой реакции. Как показывают данные, приведенные в последней колонке табл. 2, это превращение практически удобно проводить действием 0,1 М монохлоруксусной кислоты в дихлорэтаноле, где время «полной» реакции составляет от 2 до 8 мин в зависимости от природы гетероциклического основания.

В качестве детритилирующих реагентов мы исследовали главным образом галоидуксусные кислоты, а также BSA и  $ZnBr_2$ , которые наиболее часто используются в олигонуклеотидном синтезе. При изучении протонных кислот было найдено, что, как и следовало ожидать, скорость реакции возрастает с увеличением константы их диссоциации, достигая в случае сильных кислот десятков и даже нескольких миллисекунд. При этом, чем сильнее кислота, тем больше скорость ацидолиза зависит от ее концентрации. Так, на примере динуклеотида (VI) можно видеть (табл. 3), что при

Скорость детритилирования (1) и депуринизации (2) при ацидолизе динуклеотида (VI) при 20° С

№	Кислота	Концентрация, М	Растворитель	$t_{1/2}$ (1), с	$t_{1/2}$ (2), ч	$10^3 k_1/k_2$
1	BSA	0,1	MeCN	0,04	0,15 (4*)	14
2	BSA	0,1	CHCl <sub>3</sub>	<0,01	0,03 (1*)	11
3	BSA	0,1	CHCl <sub>3</sub> - MeOH, 7:3	6	5 (110*)	3
4	BSA	0,1	THF	15	4	1
5	BSA·TMU	0,1	MeCN	7	3	2
6	TFA	0,5	MeCN	1,5	60	140
7	TFA	0,1	MeCN	44		
8	TFA	0,1	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	0,087	11	450
9	TCA	0,5	MeCN	10	60	22
10	TCA	0,1	MeCN	100		
11	TCA	0,1	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	0,17	13**	270
12	DCA	0,5	MeCN	320		
13	DCA	0,1	MeCN	850		
14	DCA	0,1	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	21	41	7
15	MCA	0,5	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	60		
16	MCA	0,1	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	74		
17	HCOOH	0,2	(CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub>	100		
18	ZnBr <sub>2</sub>	1,0	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - <i>i</i> PrOH, 85:15	30	130	16
19	ZnBr <sub>2</sub>	0,5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - <i>i</i> PrOH, 85:15	220	140	2,3
20	ZnBr <sub>2</sub>	0,5	MeNO <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O, 99:1	6 (60***)	200	120
21	BF <sub>3</sub>	0,1	MeCN		0,005	

\* При 0° С.

\*\* При 30, 40, 50 и 60° С  $t_{1/2}$  депуринизации соответственно 330, 150, 90 и 40 мин.\*\*\*  $t_{1/2}$  детритилирования (DMTr)Т действием 0,1 М ZnBr<sub>2</sub> в MeNO<sub>2</sub> при 0° С по данным работы [8].

переходе от 0,1 к 0,5 М кислоте скорость детритилирования под действием TFA, TCA, DCA и MCA ( $pK_a$  0,23; 0,66; 1,25 и 2,85 [20]) возрастает соответственно в 30, 10, 2,7 и 1,2 раза.

Среди львовских кислот трехфтористый бор обладает настолько высокой активностью (табл. 3) что его вряд ли можно использовать в олигонуклеотидном синтезе. Что касается бромистого цинка, то 0,5 М раствор этой соли в 99% нитрометане [12] детритилирует динуклеотид (VI) с умеренной скоростью ( $t_{1/2}$  6 с), а в смеси хлористого метилена с изопропанолом, 85:15 [13] — намного медленнее ( $t_{1/2}$  220 с). В последнем случае концентрация реагента может быть увеличена до 1 М и скорость детритилирования возрастает при этом более чем в 7 раз. Следует отметить, что для бромистого цинка ранее был постулирован механизм избирательного отщепления 5'-диметокситритильного остатка через стадию образования хелата с участием кислотного атома фуранозного цикла [8]. Однако, по нашим данным, отщепление 5'-диметокситритильной группы под действием ZnBr<sub>2</sub> протекает не вполне селективно и в случае 3',5'-бис-DMTr-производных сопровождается отщеплением 3'-диметокситритильной группы. Поэтому представляется более вероятным, что детритилирование протонными и львовскими кислотами происходит по аналогичному механизму, включающему прямую электрофильную атаку по эфирному атому кислорода.

Изучая влияние различных факторов на ацидолиз диметокситритильной группы карбоновыми кислотами, мы обнаружили, что скорость этой реакции значительно возрастает в присутствии бромистого лития (см. табл. 4), который сам по себе не оказывает детритилирующего действия. Очевидно, этот каталитический эффект вызван ионами Li<sup>+</sup>, так как он уменьшается в присутствии бромида тетрабутиламмония, прибавление которого должно приводить к повышению концентрации Br<sup>-</sup> и, как следст-

Влияние бромистого лития на скорость детритилирования и депуринизации в ацетонитриле при 20° С

Субстрат	Реагент	$t_{1/2}$ детрит, с	$t_{1/2}$ депур, ч
(DMTr)bzC	1 М МСА	70	
«	1 М МСА+0,2 М LiBr	3	
«	1 М МСА+0,2 М Bu <sub>4</sub> NBr	60	
«	1 М МСА+0,2 М LiBr+ +0,2 М Bu <sub>4</sub> NBr	25	
(DMTr)Г≠bzA (DNBz)	0,5 М ТСА	10	60
«	0,5 М ТСА+0,2 М LiBr	0,3	0,5
«	0,5 М ТСА+1 М LiBr	0,3	0,05

вие, к уменьшению диссоциации LiBr и понижению концентрации Li<sup>+</sup>. Возможно, катион лития играет в этой реакции роль льюисовской кислоты и образует координационную связь с 5'-кислородом DMTrO-группы, тем самым облегчая ее протониз.

Важнейшим фактором, от которого сильно зависят скорость и селективность реакции детритилирования, является природа используемого растворителя. Естественно, чем слабее сольватируются образующиеся ионы, тем меньше диссоциирует исходная кислота и тем ниже равновесная концентрация протонов, но этот отрицательный эффект с избытком компенсируется повышенной активностью «оголенного» протона. Исходя из этих соображений и учитывая вопросы практической доступности, мы выбрали в качестве растворителей для реакции детритилирования хлорированные углеводороды и ацетонитрил, в котором протон является «сверхкислотой» [21], а фосфотриэфирные межнуклеотидные конденсации протекают особенно быстро [22].

Из числа хлорированных углеводородов в олигонуклеотидном синтезе обычно применяется хлороформ, в связи с чем мы вначале измеряли скорости детритилирования в этом растворителе. Однако впоследствии мы отказались от хлороформа и перешли на дихлорэтан по следующим причинам (ср. примечание 14 в работе [29]). Как известно, хлороформ неустойчив в чистом состоянии и его стабилизируют прибавлением 0,5% этанола. Мы обнаружили, что скорость детритилирования в галоидуглеводородах вообще очень чувствительна к присутствию примесей нуклеофилов, даже таких слабых, как вода, спирты и амиды, и что неполное освобождение хлороформа от спирта вызывает замедление детритилирования в десятки раз. Поэтому результаты кинетических измерений в хлороформе могли быть недостоверны из-за следов оставшегося спирта или образовавшегося хлористого водорода. Дихлорэтан же по сравнению с хлороформом значительно устойчивее, легче поддается очистке и является удобным растворителем для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов [23].

Результаты, полученные на разных субстратах с различными кислотами, показывают (см. табл. 2 и 3), что абсолютные скорости детритилирования в дихлорэтаноле значительно выше, чем в ацетонитриле (в среднем на два порядка), а при переходе от последнего к тетрагидрофурану или смесям хлороформ — метанол происходит дальнейшее сильное замедление реакции (еще на два порядка). Очевидно, наблюдаемая картина отражает общую тенденцию понижения активности протона в этих растворителях: в дихлорэтаноле он вообще не сольватирован, в ацетонитриле слабо координирован с атомом азота циангруппы, а тетрагидрофуран и спирты уже определенно связывают протон, образуя гидроксониевые соли.

Существенно, что при действии сильных кислот в галоидуглеводородах детритилирование протекает настолько быстро (например, с 0,1 М BSA в хлороформе  $t_{полн} < 0,1$  с), что практически невозможно остановить реакцию



Зависимость скорости реакции от температуры при детритилировании действием 0,1 М МСА в дихлорэтано

Субстрат	$t_{1/2}$ , с ( $k_{10}^*$ ) при			
	10° С	20° С	40° С	60° С
(DMTr) T	97	67 (1,45)	29 (1,52)	12 (1,56)
(DMTr) T		100 **	42 ** (1,54)	20 ** (1,45)
(DMTr) bzC	93	62 (1,50)	20 (1,75)	12 (1,29)
(DMTr) bzA	67	34 (1,97)	16 (1,45)	
(DMTr) T=bzA (DNBz)	98	74 (1,32)	34 (1,47)	12 (1,69)

\* Отношение величин  $t_{1/2}$  при температурах, различающихся на 10° С.

\*\* При действии 0,2 М НСООН в дихлорэтано.

вовремя и избежать значительной депуринизации. В связи с этим, чтобы замедлить обе реакции, детритилирование проводили действием BSA в смесях хлороформа с метанолом [6] или в хлористом метиле с добавкой диметилформамида [17]. Однако, по нашим данным, прибавление к кислому хлороформному или ацетонитрильному раствору различных спиртов и/или амидов (диметилформамида, диметилацетамида, тетраметилмочевины) замедляет детритилирование сильнее, чем депуринизацию, тем самым понижая селективность превращения. Поэтому представляется целесообразным не пытаться частично ингибировать реакцию нуклеофильными добавками, а просто использовать более слабые кислоты (см. ниже).

Относительные скорости детритилирования различных нуклеозидов и нуклеотидов тоже зависят решающим образом от природы растворителя. Упомянутый выше ряд скоростей детритилирования с помощью TCA в ацетонитриле (T>G>A>C) сохраняется и при действии TFA в том же растворителе (в случае DCA производное тимидина также расщепляется быстрее остальных; для МСА измерения в ацетонитриле не проводили из-за низкой скорости ацидолиза). При применении BSA абсолютные скорости детритилирования значительно выше, но их соотношение мало отличается: G>T>A>C. Если же вместо ацетонитрила используют дихлорэтан, то происходит не только сильное ускорение детритилирования, но и существенное изменение ряда относительных скоростей, в результате чего производное тимидина оказывается наиболее медленно расщепляемым среди четырех DMTr-нуклеозидов. Аналогичное соотношение скоростей детритилирования наблюдается и при применении BSA в смеси хлороформ — метанол.

Селективность отщепления DMTr-группы в различных условиях с разными кислотами изучалась нами на примере динуклеотида (VI); результаты измерения скоростей его детритилирования (реакция 1) и депуринизации (реакция 2) приведены в табл. 3. Как видно из этой таблицы, со всеми исследованными реагентами отщепление DMTr-группы протекает в тысячи раз быстрее, чем депуринизация, что позволяет получать высокий выход продукта детритилирования. Например, при действии 0,1 М метанольно-хлороформного раствора BSA ( $k_1/k_2=3000$ ) в течение 10  $t_{1/2}=1$  мин депуринизация составляет <0,2%, т. е. при наличии в олигонуклеотиде даже пяти остатков bzA выход продукта детритилирования за это время должен превысить 99%. На первый взгляд такая селективность может показаться приемлемой для любого синтеза. Однако на самом деле эта величина удовлетворительна для жидкофазного и недостаточно высока для твердофазного синтеза по следующим причинам.

При синтезе в растворе реакция начинается по всему объему немедленно после смешения реагентов и может быть остановлена в течение 1—2 с разбавлением и/или нейтрализацией реакционной смеси; в этом случае «полное» детритилирование действительно можно провести за

время, равное  $10 t_{1/2}$ , если оно значительно больше 1–2 с, как в приведенном выше примере с 0,1 М BSA. При твердофазном синтезе продолжительность реакции увеличивается вследствие меньшей реакционной способности молекул, закрепленных на полимерной матрице, а также потому, что требуется некоторое дополнительное время на прохождение реакционного раствора через слой частиц полимера-носителя и на проникновение молекул реагента внутрь этих частиц. (Естественно, то же самое относится к обратному процессу — промывке полимера для удаления реагента из сферы реакции.) Очевидно, что в случае быстро протекающих реакций скорость диффузии реагента в полимер (и обратно) может оказаться лимитирующим фактором и что олигонуклеотидные цепи, расположенные на поверхности полимерной частицы, испытывают воздействие реагента дольше и в большей концентрации, чем такие же нуклеотиды, спрятанные в глубине узких пор. Чтобы компенсировать эту топохимическую гетерогенность вещества, иммобилизованного на полимерной матрице, необходимо дальнейшее повышение селективности реакции на один, а еще лучше на два порядка по сравнению с величиной, приемлемой для синтеза в растворе.

Среди исследованных нами реагентов только TFA, TCA и  $ZnBr_2$  отвечают этим требованиям (см. табл. 3), причем  $ZnBr_2$  обладает желаемой селективностью лишь в 99% нитрометане, а в растворителе, рекомендованном Итакурой с сотр. (хлористый метилен — изопропанол, 85 : 15), соотношение  $k_1/k_2$  значительно хуже. Кроме того, действие  $ZnBr_2$  заметно ингибируется амидными группами полимера, и при возрастании их содержания (при больших нагрузках на полимер или при удлинении олигонуклеотидной цепи) детритилирование сильно замедляется, вследствие чего на эту стадию твердофазного синтеза приходится расходовать значительную часть всего времени (см., например, [15, 24]). Гораздо лучшими характеристиками обладают тригалондуксусные кислоты (особенно TFA) в дихлорэтано, где селективность детритилирования в несколько раз больше, чем в ацетонитриле. Этим кислотам значительно уступает дихлоруксусная кислота (см. табл. 3), использование которой для детритилирования описано в работе [25].

Изучение эффекта различных добавок, изменяющих активность кислотного реагента, показало, что во всех исследованных нами случаях наблюдается понижение селективности детритилирования. Так, прибавление бромистого лития (табл. 4) приводит к увеличению скорости детритилирования и одновременно к еще большему увеличению скорости депуринизации, в результате чего избирательность реакции резко снижается. Понижение активности протона прибавлением амидов, как упоминалось выше, вызывает замедление детритилирования в большей степени, чем депуринизации, что также приводит к уменьшению селективности (см. № 1 и 5 в табл. 3; данные о скоростях детритилирования и депуринизации под действием сопряженных кислот  $HCONMe_2H^+$ ,  $MeCONH_3^+$  и  $MeCONMe_2H^+$  см. [26]).

Влияние температуры на скорость детритилирования мы изучали на примере MCA в дихлорэтано — в условиях, когда это превращение протекает не слишком быстро (табл. 5). Оказалось, что температурный коэффициент реакции невелик: при повышении температуры на  $10^\circ C$  скорость детритилирования возрастает примерно в 1,5 раза, причем величина этого коэффициента ( $k_{10}$ ) почти не зависит от температуры. Несколько иной характер имеет температурная зависимость скорости депуринизации. Так, при действии на динуклеотид (VI) BSA в хлороформе или ацетонитриле (см. табл. 3, № 1, 2) скорость депуринизации при изменении температуры от 0 до  $20^\circ C$  возрастает приблизительно в 30 раз, что соответствует величине  $k_{10} \sim 5$ . При действии же TCA в дихлорэтано время  $t_{1/2}$  депуринизации при 20, 30, 40, 50 и  $60^\circ C$  составляло соответственно 780, 330, 150, 90 и 40 мин, что для  $k_{10}$  дает величины 2,4; 2,2; 1,7 и 2,2. По-видимому, и с другими кислотами при понижении температуры депуринизация замедляется в большей степени, чем детритилирование, что позволяет дополнительно повысить избирательность реакции.

Из результатов этой работы следует, что отщепление DMTr-группы в синтезе олигонуклеотидов целесообразно проводить кратковременным действием 0,1 М TFA в дихлорэтано при комнатной температуре: несколько секунд при синтезе в растворе, несколько десятков секунд при синтезе на полимере. В этих условиях избирательность детритилирования настолько высока, что можно не прибегать к повышению температуры, технически неудобному при твердофазном синтезе. TCA по свойствам близка к TFA, но несколько уступает ей в отношении скорости и избирательности детритилирования; к тому же при синтезе в растворе низкокипящую TFA проще удалять из реакционной смеси [27]. Ранее нами было показано, что дихлорэтан является практически удобным растворителем для фосфотриэфирных конденсаций, катализируемых 1-метилимидазолом [23]. Таким образом, при фосфотриэфирном синтезе олигонуклеотидов обе основные реакции — детритилирование и межнуклеотидную конденсацию — можно проводить в одном и том же растворителе — дихлорэтано, что особенно существенно для твердофазного синтеза. Следует отметить, что предварительные результаты этой работы были использованы при синтезе ряда олигонуклеотидов в растворе [27] и при разработке быстрого метода синтеза олигонуклеотидов на силикагеле [28].

### Экспериментальная часть

Количественную ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F 254 (Merck) в системе хлороформ — ацетон — метанол, 13 : 5 : 2. Растворители очищали как описано ранее [23]. TFA перегоняли с небольшим количеством  $P_2O_5$ , тщательно отделяя низкокипящую фракцию; TCA высушивали отгонкой воды с толуолом и затем кристаллизовали из того же растворителя; DCA очищали перегонкой (т. кип. 78–80° С/15 мм,  $n_D^{20}$  1,4641).

(DMTr)bzA(DNBz) (VI) получили взаимодействием 0,3 г (5 ммоль) (DMTr)bzA и 0,4 г (15 ммоль) 3,5-динитробензилхлорида в 5 мл пиридина в течение 2 ч при 20° С. После разложения реакционной смеси водным  $NaHCO_3$  и экстракции хлороформом хроматографировали на колонке с силикагелем L40/100 (Chemapol) в градиенте концентрации (0–2%) метанола в хлороформе. Выход 76%,  $R_f$  0,68 в системе хлороформ — метанол, 9 : 1.

bzA(DNBz) (VII) получен из производного (VI) при действии 2% BSA в смеси хлороформ — метанол, 7 : 3 (3 мин при 0° С), с последующей обработкой и хроматографией, как описано выше.

(DMTr)Tr(CiPh)bzA(DNBz) (VIII) получен взаимодействием 140 мг (255 мкмоль) нуклеозида (VII), 400 мг (500 мкмоль) (DMTr)Tr(CiPh) и 214 мг (640 мкмоль) 2,4,6-триизопропилбензолсульфотетраоксида [6] в 1,5 мл пиридина в течение 40 мин при 20° С. После обработки реакционной смеси водным пиридином и упаривания хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации (0–6%) метанола в хлороформе. Выход 68%,  $R_f$  0,66,  $\lambda_{max}$  208, 278 нм ( $A_{208}/A_{278}=3,36$ ).

*Измерение скорости детритилирования.* 1 мл детритилирующего раствора смешивали в спектральной кювете с 1 мл раствора DMTr-производного и по величине  $A_{500}$  определяли количество отщепляющегося катиона DMTr<sup>+</sup> (прибор Gilford 2400-2). Скорость быстрых реакций измеряли методом остановленной струи на кинетическом спектрофотометре Durrum D-110. Реагенты смешивались в объемном соотношении 1 : 1 (мертвое время прибора 2 мс) и поступали в термостатированную при 20° С кювету с длиной оптического пути 20 мм. Изменение величины пропускания раствора в ходе реакции ( $\lambda$  500 нм, ширина щели 15 нм) регистрировалось с помощью цифрового запоминающего осциллографа Explorer IIIA Nicolet, соединенного с двухкоординатным самописцем. Полученные кривые с помощью дигитайзера вводились в мини-ЭВМ HP-9830A (Hewlett-Packard) и обрабатывались по специальной программе на языке «basic». Программа позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые многоэкспоненциальной функцией по методу наименьших квадратов путем логарифмирования и последовательного выделения экспонент, начиная

с самой медленной, и хорошо разделяет экспоненты с показателями, различающимися не менее чем в 3 раза.

*Измерение скорости депуринизации.* К 2 мг (DMTr)Tr(CIPh)bzA (DNBz) (VIII) прибавляли 300 мкл раствора кислоты и аликваты (20 мкл) хроматографировали в тонком слое (если реакционная смесь содержала кислоту Льюиса или LiBr, то перед ТСХ пробу разбавляли хлороформом и промывали водой). Зону исходного вещества удаляли с пластинки и элюировали 1 мл ацетона, к элюату прибавляли 30 мкл 2 н. NaOH, встряхивали 10 с и немедленно измеряли поглощение при 416 и 574 нм. Таким же образом анализировали продукты депуринизации (для этого проводили элюцию сорбента, оставшегося после удаления зоны исходного вещества). Для контроля определяли поглощение раствора, полученного из 20 мкл нехроматографировавшейся смеси.

Авторы благодарны В. Н. Добрынину и С. С. Смогоржевскому за образцы 3'-DMTr-нулеозидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 12, p. 3821-3827.
2. Brown E. L., Belagaje R., Ryan M. J., Khorana H. G. In: Methods in Enzymol., v. 68. Recombinant DNA/Ed. Wu R. New York: Acad. Press, 1979, p. 109-151.
3. Catlin J. C., Cramer F. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 2, p. 245-250.
4. Schaller H., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 12, p. 3828-3835.
5. Reese C. B. Tetrahedron, 1978, v. 34, № 21, p. 3143-3179.
6. Narang S. A., Brouseau R., Hsiung H. M., Michniewicz J. J. In: Methods in Enzymol., v. 65. Nucleic Acids, Part 1/Eds Grossman L., Moldave K. New York: Acad. Press, 1980, p. 610-620.
7. Smith M., Rammler D. H., Goldberg L. H., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, № 2, p. 430-440.
8. Matteucci M. D., Caruthers M. H. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 34, p. 3243-3246.
9. Kohli V., Blöcker H., Köster H. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 28, p. 2683-2686.
10. Duckworth M. L., Gait M. J., Golet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691-1706.
11. Gait M. J., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., Symp. Ser., 1980, № 7, p. 243-257.
12. Chow F., Kempe T., Palm G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2807-2817.
13. Kierzek R., Ito H., Bhatt R., Itakura K. Tetrahedron Lett., 1981, v. 22, № 38, p. 3761-3764.
14. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185-3191.
15. Ito H., Ike J., Ikuia S., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1755-1769.
16. Tanaka T., Letsinger R. L. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 10, p. 3249-3260.
17. Patel T. P., Millican T. A., Bose C. C., Titmas R. C., Mock G. A., Eaton M. A. W. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 18, p. 5605-5620.
18. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
19. Кричфилд Ф. Анализ основных функциональных групп в органических соединениях. М.: Мир, 1965, с. 122-125.
20. Альберт А., Сердженг Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.: Химия, 1964, с. 118.
21. Паркер А. В кн.: Успехи органической химии. М.: Мир, 1968, т. 5, с. 26.
22. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 660-666.
23. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 511-515.
24. Kohli V., Balland A., Wintzerith M., Sauerwald R., Staub A., Lecocq J. P. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 22, p. 7439-7448.
25. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 3, p. 661-663.
26. Буткус В. В. Изучение фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов. Автореф. дис. ...канд. хим. наук/Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. М., 1983, 21 с.
27. Буткус В. В., Климашauskas С. И., Берлин Ю. А. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1343-1348.
28. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова П. В., Колосов М. Н. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 706-710.
29. Gait M. J., Matthes H. W. D., Singh M., Sproat B. S., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6243-6254.

Поступила в редакцию  
7.VI.1983

CLEAVAGE OF 5'-O-PROTECTING TRITYL GROUPS IN OLIGODEOXYNUCLEOTIDE SYNTHESIS. EFFECT OF SUBSTRATE STRUCTURE AND REACTION CONDITIONS ON DETRITYLATION AND DEPURINATION RATES

BUTKUS V. V., KAYUSHIN A. L., BERLIN Yu. A.,  
KOLOSOV M. N., SMIRNOV I. V.

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

Effects of substrate structure and of reaction conditions on detritylation and depurination rates of DMTr-deoxynucleotides and -nucleosides at the action of benzenesulphonic acid, zinc bromide, trifluoroacetic, tri- and dichloroacetic, and some other acids have been studied. Trifluoroacetic acid in dichloroethane was found the most selective in the detritylation reaction ( $k_{\text{detr}}/k_{\text{depur}}=4,5 \times 10^5$ ). Taken together with previous data on solvent effects in internucleotide couplings, the results of the present study show dichloroethane to be the solvent of choice for both 5'-deprotection and phosphotriester condensation in oligonucleotide synthesis.