



УДК 547.963.32.07 : 542.953.2

НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ КОНДЕНСАЦИИ В ФОСФОТРИЭФИРНОМ СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

II *. КАТАЛИЗ 1-МЕТИЛИМИДАЗОЛОМ В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Еаюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н.

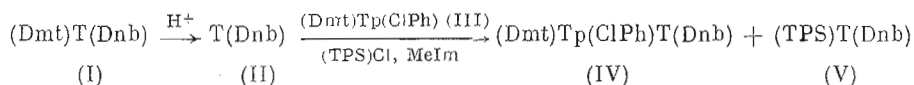
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследована реакция 3'-динитробензоилтимидина (II) с 5'-диметокситригилтимидил-3'-хлорфенилфосфатом (III) и TPS-хлоридом в присутствии 1-метylimидазола в диметилацетамиде, ацетонитриле, пиридине, дихлорэтане, хлористом метиле, хлороформе, тетрагидрофуране и диоксане. Измерены скорости конденсации нуклеозида (II) с фосфатом (III) и O-сульфонилирования нуклеозида (II). Найдено, что практически удобными растворителями для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов являются хлорированные углеводороды, особенно дихлорэтан, в котором катализируемая метylimидазолом межнуклеотидная конденсация протекает примерно с такой же скоростью, как в пиридине.

Ранее при изучении нуклеофильного катализа фосфотриэфирной межнуклеотидной конденсации 4-диметиламинопиридином и азолами (тетразолом, нитротриазолом и MeIm) было обнаружено, что активность этих катализаторов сильно зависит от природы растворителя, причем наиболее быстро реакция протекает в присутствии MeIm в ацетонитриле [1]. В связи с этим мы исследовали влияние более широкого круга растворителей на каталитический эффект MeIm с целью оптимизации условий фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов.

Исследование проводилось на примере конденсации 3'-защищенного тимидина (II) с 5'-диметокситригилтимидил-3'-хлорфенилфосфатом (III) под действием TPS-хлорида и MeIm (схема 1). В качестве 3'-защитной группы использовали 3,5-динитробензоильную, чтобы иметь возможность количественно анализировать состав реакционных смесей колориметрическим методом. Для этого вначале из 5'-O-диметокситригилтимидина был получен 3'-динитробензоат (I), который, с одной стороны, был гидролизован до 5'-оксисоединения (II), а с другой — послужил стандартом для колориметрического анализа. Определение в нем Dmt-группы (в виде тригилевого катиона в кислом растворе) и Dnb-группы (в виде хиноидного анiona в щелочной среде по модифицированному методу [2]) показало, что эквимолярному содержанию обеих групп соответствует отношение экстинкций $\epsilon_{320}^+ \epsilon_{416}^- = 3,14$, и на этой величине основывались в дальнейшем при расчете содержания продукта межнуклеотидной конденсации (IV) в его смесях с исходным нуклеозидом (II) и продуктом сульфонилирования (V) (см. ниже).

Схема 1



* Сообщение I см. [1]. Используются следующие нестандартные сокращения: ClPh — 4-хлорфенил, Dmt — 4,4'-диметокситригил, Dnb — 3,5-динитробензоил, MeIm — 1-метylimидазол, TPS — 2,4,6-трипропилбензолсульфонил. В формулах (и названиях) нуклеотидов и нуклеозидов префикс d (дезокс) для краткости опущен.

Влияние растворителя на скорость межнуклеотидной конденсации ((II) + (III) → (IV)) и сульфонилирования ((II) → (V)) под действием TPS-хлорида и 1-метилимидазола

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость, ϵ [3]	Период полупревращения ($t_{1/2}$)	
		конденсация, мин	сульфонилирование, ч
Диметилацетамид	37,8	38	
Ацетонитрил	36,2	5	7
Пиридин	12,3	15	80*
Дихлорэтан	10,4	15	20
Хлористый метилен	8,9	16	8
Тетрагидрофуран	7,3	34	
Хлороформ	4,7	23	21
Диоксан	2,2	97	**

* Через 24 ч выход продукта сульфонилирования (V) 29%, через 48 ч — 36%, что при экстраполяции дает $t_{1/2} \sim 80$ ч.

** Выход продукта сульфонилирования (V) через 24 ч составил 23%.

При выборе растворителей для межнуклеотидной конденсации мы стремились по возможности испытать вещества разных химических классов, различающиеся по своей диэлектрической проницаемости и сольватирующей способности. Однако при этом необходимо было учитывать также, насколько тот или иной растворитель практически доступен и насколько легко он поддается очистке и абсолютированию. Исходя из этих соображений были избраны следующие четыре группы растворителей: хлорированные углеводороды (хлороформ, хлористый метилен, дихлорэтан), простые эфиры (диоксан, тетрагидрофуран), гетероароматические основания (пиридин) и высокополярные апротонные растворители (диметилацетамид, ацетонитрил).

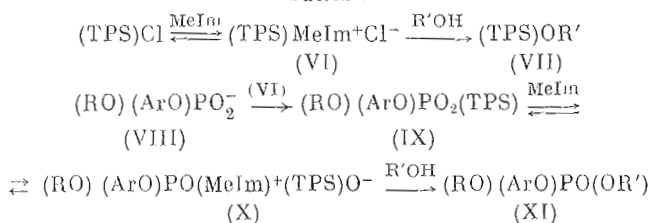
В некоторых из этих растворителей динитробензоат тимидина (II) оказался труднорастворимым, вследствие чего межнуклеотидные конденсации пришлось проводить при очень низкой его концентрации (2,4 мМ). Чтобы обеспечить достаточно быстрое протекание реакции, Р-компонент (III) при этом брали в концентрации, на порядок более высокой (29 мМ), а конденсирующий реагент (0,09 М (TPS)Cl) и нуклеофильный катализатор (0,24 М MeIm) — соответственно в трех- и восьмикратном избытке по отношению к фосфатному компоненту. Следует отметить, что такие условия существенно отличаются от обычно используемых при межнуклеотидной конденсации в растворе и лучше моделируют твердофазный синтез, при котором применение концентрированных растворов Р-компонента нежелательно, так как приводит к непроизводительной трате ценного нуклеотидного материала. Очевидно также, что при использованных нами больших молярных избытках Р-компонента, TPS-хлорида и MeIm межнуклеотидная конденсация может с достаточной для практических целей точностью рассматриваться как реакция первого порядка по ОН-компоненту.

Поэтому влияние растворителя на скорость межнуклеотидной конденсации мы оценивали по времени полупревращения нуклеозида (II), которое определяли из кинетических кривых, построенных по данным анализа реакционных смесей через 10, 20, 40, 60 и 180 мин после смешения реагентов. В аналогичных условиях, но в отсутствие нуклеотида (III) измеряли скорость побочной реакции сульфонилирования нуклеозида (II) с образованием TPS-производного (V). Полученные результаты представлены в таблице.

Как следует из таблицы, во всех случаях межнуклеотидная конденсация протекает настолько быстрее реакции \mathcal{O} -сульфонилирования гидроксильного компонента, что для практических целей олигонуклеотидного синтеза последняя не имеет значения. В однотипных растворителях наблюдается определенное соответствие между диэлектрической проницае-

мостью среды и скоростью межнуклеотидной конденсации (см. ряды диоксан — тетрагидрофуран и хлороформ — хлористый метилен — дихлорэтан). Однако эта закономерность не соблюдается в случае растворителей разных химических групп, как видно прежде всего при сравнении диметилацетамида и ацетонитрила, которые имеют очень близкие величины диэлектрической проницаемости, но сильно различаются по их влиянию на скорость конденсации (ср. также хлороформ и тетрагидрофуран). Обращает на себя внимание также отсутствие пропорциональности в изменениях скорости сульфонилирования и конденсации при смене растворителя; так, отношение величин k_2 для этих реакций в пиридине превышает 300, в ацетонитриле равно 84, а в хлористом метиле — 30. Вероятно, это объясняется тем, что в ходе межнуклеотидной конденсации MeIm дважды выступает в роли нуклеофильного катализатора: сначала он активирует TPS-хлорид, а затем смешанный фосфорносульфоновый ангидрид (IX) (см. схему 2), превращая их в соответствующие метилимидазолиевые производные (VI) и (X), тогда как в процессе O-сульфонилирования он выполняет только первую из этих функций. (Кроме того, в обоих превращениях MeIm может участвовать в качестве общесосновного катализатора, способствуя депротонированию OH-группы нуклеозида при ее взаимодействии с сульфонил-(VI) или фосфорилимидазолем (X).) Реакцией, лимитирующей суммарную скорость конденсации, является последняя стадия этого сложного процесса — фосфорилирование нуклеозида R'OH с образованием фосфотриэфира (XI) (см. обсуждение механизма межнуклеотидной конденсации в статье [1]). Поэтому можно считать, что изменение скорости межнуклеотидной конденсации при переходе от одного растворителя к другому отражает в первую очередь эффект растворителя на нуклеофильный катализ в заключительной стадии конденсации, а не при взаимодействии с TPS-хлоридом, как это происходит в случае побочной реакции O-сульфонилирования нуклеозида.

Схема 2



Полученные нами результаты подтверждают данные предыдущей работы [1] о том, что катализируемая MeIm фосфотриэфирная межнуклеотидная конденсация быстрее всего протекает в ацетонитриле. Очень хорошими растворителями для этой реакции являются также хлорированные углеводороды, так как по своей эффективности они не уступают пиридину, обычно используемому при межнуклеотидной конденсации, и обладают тем достоинством, что (в отличие от ацетонитрила и пиридина) они негигроскопичны; кроме того, они дешевы, доступны в больших количествах и легко поддаются очистке и обезвоживанию. Среди этих растворителей дихлорэтан и хлористый метилен приблизительно равноценны (тогда как в хлороформе реакция протекает заметно медленнее), но первый из них удобнее в практическом отношении благодаря меньшей летучести и меньшей скорости побочной реакции сульфонилирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали тимидин фирмы Calbiochem (США); его 5'-диметокситриптильное производное (I) и 3'-(*n*-хлорфенил)фосфат (III) синтезировали как описано в работе [4], причем децианэтилирование проводили по методу [5]; о получении MeIm (n_D^{23} 1,4975) см. [6]. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, СССР) и силикагеле L 40/100 той же фирмы. Хлороформ, хлористый метилен и дихлорэтан пропускали

через слой Al_2O_3 , прокаленной в течение 5 ч при 300°C , и перегоняли над P_2O_5 ; пиридин перегоняли над BaO и затем над CaH_2 ; ацетонитрил высушивали CaCl_2 и перегоняли последовательно над P_2O_5 и CaH_2 ; диметилацетамид кипятили с CaH_2 и перегоняли (т. кип. $65\text{--}66^\circ\text{C}/12\text{ мм}$); тетрагидрофуран и диоксан перегоняли над KOH , натрием и хранили над натрием; остальные растворители после очистки хранили над молекулярными ситами 4А.

3'-О-Динитробензоилтимидин (II) получен взаимодействием 442 мг (1,9 ммоль) 3,5-динитробензилхлорида и 451 мг (0,83 ммоль) диметокситритилтимидина в 5 мл пиридина в течение 2 ч при 20°C . После разложения метаолом раствор упарили с толуолом и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем ($2\times 8\text{ см}$) в хлороформе. Выделенный упариванием соответствующих фракций 5'-О-диметокситритил-3'-О-динитробензоилтимидин (I) (R_f 0,44 в системе хлороформ — метанол, 9:1) обработали 80% уксусной кислотой (30 мин) и после упаривания с толуолом выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из спирта. Выход динитробензоилтимидина (II) 272 мг (76%), т. пл. $233\text{--}234^\circ\text{C}$.

Влияние растворителя на скорость межнуклеотидной конденсации. Смесь 1 мг (2,4 мкмоль) соединения (II) и (Dmt)Tp(ClPh), полученного децанэтилированием 22 мг (28,6 мкмоль) (Dmt)Tp(ClPh) (CNEt), высушивали трехкратным упариванием с пиридином, добавляли раствор 14 мг (92 мкмоль) TPS-хлорида и 20 мкл (240 мкмоль) MeIm в 1 мл соответствующего растворителя и выдерживали при 35°C . Через 10, 20, 40, 60 и 180 мин отбирали пробы (по 200 мкл), их обрабатывали 200 мкл воды (30 мин), упаривали с толуолом, остаток растворяли в 100 мкл ацетона и подвергали ТСХ в системе хлороформ — ацетон — метанол, 13:5:2. Из зоны с R_f 0,40—0,50, содержащей исходный ОН-компонент (II) и продукт конденсации (IV), смесь веществ элюировали 3 мл ацетона. Относительное содержание Dmt- и Dnb-групп в элюате определяли следующим образом: а) к 0,7 мл элюата приливали 0,7 мл смеси 70% $\text{HClO}_4\text{--MeOH}$, 1:1, после чего спектрофотометрировали при 420 нм; б) к 1,5 мл элюата прибавляли 20 мкл 2 н. NaOH и через 30 с спектрофотометрировали при 416 нм. Количество образовавшегося продукта межнуклеотидной конденсации рассчитывали по формуле $\text{выход}(\%) = 100A_{420}/1,59A_{416}$, где коэффициент 1,59 основан на соотношении $\epsilon_{420}^+/\epsilon_{416}^- = 3,14$, (см. выше) и учитывает различие в концентрации кислого (а) и щелочного (б) растворов.

При проведении реакции в диметилацетамиде остаток после удаления пиридина хроматографировали на колонке с силикагелем ($1\times 10\text{ см}$), элюируя продукт конденсации хлороформом, а исходный динитробензоат (II) — 5% метанолом в хлороформе. Фракции упаривали, остаток в каждом случае растворяли в 10 мл ацетона и определяли A_{420}/A_{416} в обеих фракциях.

Сульфонилирование динитробензоилтимидина (II). Реакцию и последующую ТСХ проводили как в предыдущем опыте, но в отсутствие P-компонента. Вещества из зон, содержащих продукт сульфонилирования (V) (R_f 0,82) и исходный нуклеозид (II) (R_f 0,64), элюировали ацетоном (по 1,5 мл) и определяли отношение содержания динитробензоильных групп (по величинам A_{416}) в обоих элюатах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 660—666.
2. Кричфилд Ф. Анализ основных функциональных групп в органических соединениях. М.: Мир, 1965, с. 122—124.
3. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 12—16.
4. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
5. Crea R., Kraszlewski A., Hirose T., Itakura K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765—5769.
6. Häring M. Helv. chim. acta, 1959, v. 42, № 6, p. 1845—1846.

Поступила в редакцию
25.X.1982

NUCLEOPHILIC CATALYSIS OF INTERNUCLEOTIDE CONDENSATIONS
IN PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES.

II. 1-METHYLIMIDAZOLE CATALYSIS IN VARIOUS SOLVENTS

KAYUSHIN A. L., BERLIN Yu. A., KOLOSOV M. N.

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

Triisopropylbenzenesulphonyl chloride effected condensation of 3'-(3,5-dinitro)benzoylthymidine (II) with 4-chlorophenyl 5'-dimethoxytritylthymidine-3'-phosphate (III) in the presence of 1-methylimidazole was studied in a variety of solvents, including dimethylacetamide, acetonitrile, pyridine, dichloroethane, methylene chloride, chloroform, tetrahydrofuran, and dioxane. Reaction rates for the condensation (II)+(III) and O-sulphonylation of (II) were measured, acetonitrile, among the solvents studied, most actively promoting the reactions. For practical reasons the chlorinated hydrocarbons have been found especially useful for the deoxynucleotide synthesis, the solvent of choice being dichloroethane which, in the methylimidazole catalysed phosphotriester condensation, is as effective as pyridine.