



УДК 577.113.6

СИНТЕЗ 2', 3'-ЦИКЛИЧЕСКИХ АЦЕТАЛЕЙ
(2'-5')ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ И АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ
НА ИХ ОСНОВЕ

Квасюк Е. И., Кулак Т. И., Зайцева Г. В., Михайлопуло И. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Пфляйдерер В.

Университет г. Констанц, Констанц, ФРГ

С помощью триэфирного метода получены тример (2'-5') олигоадениловой кислоты и его 3'-дезоксиналог, содержащие (2-карбоксиэтил)этилиденную группировку на терминирующем фрагменте. Синтезированные тримеры использовались в качестве лигандов для получения аффинных сорбентов путем их ковалентного связывания с АН-сефарозой 4В.

Один из путей противовирусного действия интерферона связан с возникновением в клетке 5'-трифосфатов (2'-5') олигоадениловой кислоты $[(2'-5')pppA(pA)_n]$, где $n \geq 2$, которые в наномолярной концентрации активируют латентную эндонуклеазу L [1, 2], что приводит к расщеплению мРНК вируса и, как следствие, к ингибированию синтеза белка [3-6].

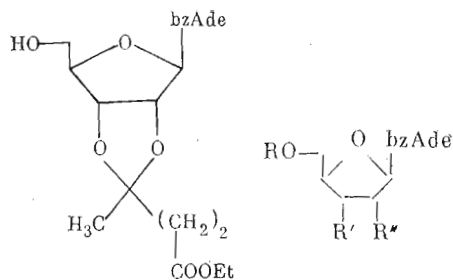
С целью выделения эндонуклеазы L нами осуществлен синтез (2'-5')-тримера адениловой кислоты и его 3'-дезоксиналога, содержащих (2-карбоксиэтил)этилиденную группировку по терминальному аденозиновому фрагменту $[(2'-5')(Ap)_2A>Cee]$ и $(2'-5')(3'dAp)_2A>Cee]$, которые были использованы в качестве лигандов для получения аффинных сорбентов.

Ранее было показано [7-9], что использование (2-карбоксиэтил)этилиденной группировки для связывания ряда нуклеозидов и нуклеотидов с матрицей приводит к получению высокоэффективных аффинных сорбентов для выделения ферментов обмена нуклеиновых кислот.

Синтез терминального фрагмента — 2',3'-О-(2-этоксикарбонилэтил)этилиден-6-N-бензоиладенозина (I) — был осуществлен исходя из 6-N-бензоиладенозина [10] согласно методике, описанной в работе [11], с выходом 79%. Для получения надстраивающего фрагмента — диэфира (VII) — N-6-бензоил-5'-О-монометокситрииладенозин (II) [12] обрабатывали бензоилцианидом [13] в ацетонитриле при комнатной температуре в присутствии триэтиламина. Образующаяся смесь бензоильных производных (III) — (V) была разделена на индивидуальные соединения колоночной хроматографией на силикагеле (выходы 36,9; 52 и 22,5% соответственно). Фосфорилированием 6-N'-3'-О-дibenzoил-5'-О-монометокситрииладенозина (III) бистриазолидом 2,5-дихлорфенилфосфата [14], последующей обработкой реакционной смеси избытком β-(n-нитрофенил)этанол и хроматографией на силикагеле был получен фосфат (VI) с выходом 89%. Обработка триэфира (VI) n-нитробензальдоксимом [15] и последующая хроматография на силикагеле давали 6-N,3'-О-дibenzoил-5'-О-монометокситрииладенозин-2'-(n-нитрофенилэтил)фосфат (VII) с выходом 90% (схема).

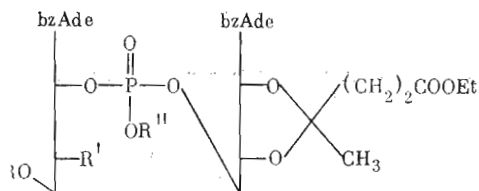
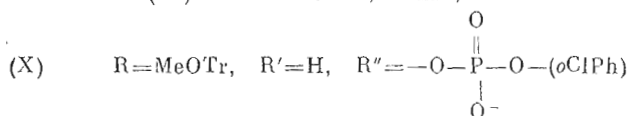
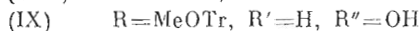
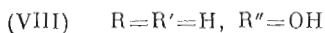
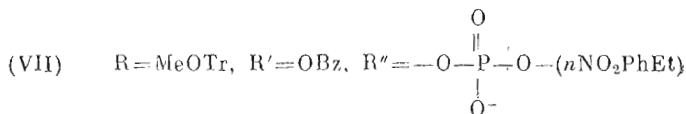
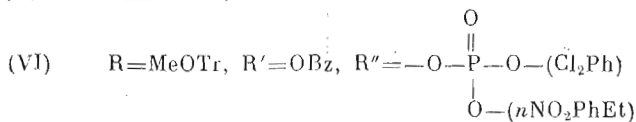
Конденсацией концевго нуклеозида (I) и диэфира (VII) в присутствии смеси хинолин-8-сульфохлорида и 3-нитро-1,2,4-триазола [16] был

Сокращения: oClPh — 2-хлорфенил, Cl₂Ph — 2,5-дихлорфенил, nNO₂PhEt — 2-(4-нитрофенил)этил, Cee — (2-карбоксиэтил)этилиден, 3'dA — остаток 3'-дезоксинаденозина.

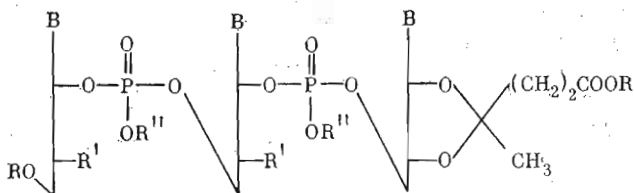


(I)

- (II) R=MeOTr, R'=R''=OH
 (III) R=MeOTr, R'=OBz, R''=OH
 (IV) R=MeOTr, R'=OH, R''=OBz
 (V) R=MeOTr, R'=R''=OBz



- (XI) R=MeOTr, R'=OBz, R''=nNO₂PhEt
 (XII) R=H, R'=OBz, R''=nNO₂PhEt
 (XIII) R=MeOTr, R'=H, R''=oClPh
 (XIV) R=R'=H, R''=oClPh



- (XV) R=MeOTr, R'=OBz, R''=nNO₂PhEt, R'''=Et, B=bzAde
 (XVI) R=MeOTr, R'=H, R''=oClPh, R'''=Et, B=bzAde
 (XVII) R=R''=R'''=H, R'=OH, B=Ade
 (XVIII) R=R'=R''=R'''=H, B=Ade

¹H-ЯМР-спектры
Приведены химические сдвиги (δ , м. д.) и константы

Соединение	H-2 и H-8	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'
(I)	8,74с, 8,63с	6,27д	5,49дд	5,03дд	4,27м
(II)	8,68с	6,08д	4,70дд	4,42дд	4,24м
(III)	8,61с, 8,20с	6,13д	5,19дд	5,64дд	4,44м
(IV)	8,65с, 8,13с	6,34д	5,97дд	4,95дд	4,27м
(V)	8,71с, 8,26с	6,55д	6,39дд	6,06дд	4,54м
(VI) ***	8,71с, 8,66с 8,58с, 8,52с	6,58д, 6,54д	6,30м (2H)	6,01м (2H)	4,55м (2H)
(VII)	8,67с	6,40д	5,74м	5,93дд	4,44м
(XVII)	6,87с, 6,83с, 6,81с, 6,64с, 6,61с, 6,46с	4,82д, 4,79д, 4,56д	3,92, 3,81м (2H)		
(XVIII)	6,84с, 6,83с, 6,77с, 6,65с, 6,58с, 6,56с	4,82д, 4,71д, 4,47с	4,04дд, 3,96м, 3,91м		

* Спектры соединений (I), (XVII), (XVIII) записаны на спектрометре WM-360, соединены производных (I), (VI) и (VII) сняты в DMSO-d₆, соединений (XVII), (XVIII) — CD₃OD. Величины химических сдвигов соединений (XVII) и (XVIII) приведены относительно метилсилана.

** Обозначение CH₃^{Cee} соответствует 5-метильному остатку Cee-группы или (2-этоксикар

*** Вещество представляет собой смесь диастереомеров.

получен полностью защищенный динуклеозидмонофосфат (XI), выделенный хроматографией на силикагеле с выходом 88,6%. Селективное детритилирование соединения (XI) действием 2% раствора толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен — метанол (7:3) и последующая хроматография на силикагеле давали динуклеозидмонофосфат (XII) с выходом 78,9%. Конденсацией соединения (XII) и диэфира (VII) в условиях, аналогичных указанным выше при синтезе динуклеозидмонофосфата (XI), был получен полностью защищенный тринуклеозиддифосфат (XV) с выходом 70,8%. Последовательной обработкой соединения (XV) 2% раствором *n*-толуолсульфокислоты (как описано выше), раствором 1,8-диазабипцикло[5,4,0]ундецена-7 в пиридине [14], насыщенным при 0°С раствором аммиака в метаноле, 0,5 М раствором NaOH в смеси этанол — вода (1:1) и хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (НСО-форма) был получен аденилил (2'→5') аденилил (2'→5')-2',3'-О-(карбоксиэтил) этилиденаденозин [(2'-5') (Ap)₂A>Cee] (XVII) с выходом 46%.

В синтезе 3'-дезоксиналога (2'-5') (3'dAp)₂A>Cee для получения надстраивающего фрагмента — диэфира (X) — в качестве исходного соединения был выбран 6-N-бензоил-3'-дезоксид-5'-О-монометокситритиладено-

полученных соединений
спин-спинового взаимодействия (J , Гц) *

Н-5' а, б	Прочие**	$J_{1', 2'}$	$J_{2', 3'}$	$J_{3', 4'}$
3,53м	11,08с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 8,03–7,51м (5Н, Bz), 4,08к (2Н, OCH_2CH_3), 2,51м ($\text{DMSO}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$), 2,09т (2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$), 1,33с (3Н, CH_3^{Cee}), 1,21т (3Н, OCH_2CH_3)	2,5	6,7	2,1
3,40м	10,32с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 7,99–6,67 (ароматич.)	5,0	5,0	5,0
3,43м	9,30с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 8,00–6,66 (ароматич.)	6,0	6,0	3,5
3,42м	9,39с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 8,00–6,66 (ароматич.)	5,0	5,0	5,0
3,60м	9,60с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 8,01–6,69 (ароматич.)	6,0	6,0	2,5
3,44м (4Н)	11,31с (2Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 8,09–8,79 (ароматич.), 3,69с (6Н, OMe), 4,28м (4Н, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2,89м (4Н, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$)	5,5 5,8		
3,45м	11,28с (1Н, $\text{NH}\underline{\text{Bz}}$), 3,74с (3Н, OMe), 3,62м (2Н, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2,90м (2Н, NCH_2CH_3), 2,66м (2Н, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1,04м (3Н, NCH_2CH_3)	5,8	5,5	5,6
	1,15дд (2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 0,89дд (2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 0,15с (3Н, CH_3^{Cee})	4,2 3,1		
	1,13дд (2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 0,88дд (2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 0,14с (3Н, CH_3^{Cee})	<1 3,5		

ний (II)–(V) — на спектрометре PS-100, а соединений (VI), (VII) — на спектрометре WM-250. в D_2O , прочие — в CDCl_3 (для увеличения растворимости соединения (II) добавлено 10% трет-бутанола в качестве внутреннего стандарта, прочих соединений — относительно тетра-

бонилэтил)этиленовой группы.

зин (IX), полученный из 6-N-бензоил-3'-дезоксаденозина (VIII) [17] с выходом 69%. Фосфорилированием соединения (IX) бистриазолидом *o*-хлорфенилфосфата [18] был получен 6-N-бензоил-3'-дезоксидеокси-5'-O-метокситригиладенозин-2'-(*o*-хлорфенил)фосфат (X) с выходом 84%. Конденсацией диэфира (X) с концевым нуклеозидом (I) в присутствии смеси триизопропилбензолсульфохлорида и 3-нитро-1,2,4-триазола и последующей хроматографией на силикагеле был получен полностью защищенный динуклеозидмонофосфат (XIII) с выходом 86%. Детритилированием соединения (XIII) действием 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол (7 : 3) был получен динуклеозидмонофосфат (XIV) (91,5%), конденсацией которого с диэфиром (X) в условиях, описанных при получении соединения (XIII), с последующей хроматографией на силикагеле был выделен полностью защищенный тринуклеозиддифосфат (XVI) (87%). Деблокирование соединения (XVI) последовательно действием 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты, *n*-нитробензальдоксимом [15], насыщенным при 0° С раствором аммиака в метаноле, 0,5 М раствором NaOH в смеси этанол — вода (1 : 1) и хроматография на DEAE-сефадексе А-25 (HCO_3^- -форма) приводили к 3'-дезоксиденилил(2' → 5')

3'-дезоксиаденилил (2' → 5')-2',3'-O-(2-карбоксиитил)этилиденаденозину [(2'-5') (3'dAp)₂A>Cee] (XVIII), выделенному с выходом 46%.

Строение синтезированных тримеров было подтверждено данными УФ- и ¹H-ЯМР-спектроскопии (таблица).

Химическое связывание тримеров (XVII) и (XVIII) с АН-сефарозой 4В было осуществлено с использованием гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида согласно методу [7]. Количество химически связанного лиганда определялось спектрофотометрически после гидролиза пробы аффинного сорбента 0,5 М водным раствором соляной кислоты и составило 0,86 и 1,39 мкмоль лиганда на 1 мл набухшего геля для соединений (XVII) и (XVIII) соответственно.

Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометрах JNM PS-100 (Jeol, Япония), WM-250 и WM-360 (Bruker, ФРГ). В спектрах ¹H-ЯМР приняты следующие сокращения: с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублетов, т — триплет, м — мультиплет. ТСХ проводили на пластинках силикагеля F 1500 LS 254 и целлюлозы F 1440 LS 254 (Schleicher und Schüll, ФРГ). Системы растворителей для ТСХ на силикагеле: хлороформ — метанол, 9:1 (А); этилацетат (Б); хлороформ — метанол, 25:1 (В); хлороформ — метанол, 4:1 (Г); хлороформ — этанол, 9:1 (Д); для ТСХ на целлюлозе — *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 5:3:2 (Е); изопропиловый спирт — гидроокись аммония (25%) — вода, 5:1:3 (Ж). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (ЧССР). Все операции, если специально не оговорено в тексте, проводились при комнатной температуре.

6-N-Бензоил-2',3'-O-(2-этоксикарбонилэтил)этилиденаденозин (I). К суспензии 3 г (8,08 ммоль) 6-N-бензоиладенозина добавили 8,82 г (40,4 ммоль) диэтилацетата этилового эфира левулиновой кислоты [11], смесь охладили до 0°С, по каплям при перемешивании добавили 10 мл 7 М раствора HCl в диоксане. После растворения исходного соединения раствор выдержали в течение 3 ч и добавили при перемешивании к 1 л эфира. Выпавший осадок отфильтровали, растворили в 300 мл хлороформа, полученный раствор промыли насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 100 мл), высушили безводным Na₂SO₄ и упарили. Сиропообразный остаток хроматографировали на силикагеле (70 см³, элюент — хлороформ). Фракции, содержащие соединение (I), упаривали до объема 15 мл и при перемешивании добавили к 300 мл гексана. Выпавший осадок отфильтровали, высушили. Получили 3,17 г (78,9%) соединения (I) в виде аморфного порошка, т. пл. 91–93°С, *R*_f 0,65 (А). УФ-спектр, λ_{макс}^{CH₃OH}, нм (lg ε): 233 (4,20), 280 (4,36).

Бензоилирование 6-N-бензоил-5'-O-монометокситритиладенозина (II). К суспензии 5,0 г (7,7 ммоль) монометокситригильного производного (II) в смеси 250 мл ацетонитрила и 0,5 мл триэтиламина при перемешивании добавили в течение 10 ч раствор 1,31 г (10,0 ммоль) бензоилцианида в 50 мл ацетонитрила и перемешали до исчезновения исходного соединения (контроль по данным ТСХ). Раствор упарили, остаток хроматографировали на силикагеле (600 см³), элюируя продукты этилацетатом в гексане (линейный градиент 50→100%). Общий объем 4 л. Фракции, содержащие индивидуальные соединения, объединили, упарили и кристаллизовали. 6-N, 3'-O-Дибензоил-5'-O-монометокситритиладенозин (III), выход 2,1 г (36,9%), т. пл. 119–121°С (этанол), *R*_f 0,55 (Б). УФ-спектр, λ_{макс}^{CH₃OH}, нм (lg ε): 232 (4,60), 281 (4,33). Найдено, %: С 71,03; Н 4,50; N 9,00. С₄₄H₃₇O₇N₅. Вычислено, %: С 70,67; Н 4,98; N 9,36.

6-N,2'-O-Дибензоил-5'-O-монометокситритиладенозин (IV), выход 0,3 г (5,2%), т. пл. 119–123°С (аморфный порошок), *R*_f 0,65 (Б). УФ-спектр, λ_{макс}^{CH₃OH}, нм (lg ε): 233 (4,59), 281 (4,34). Найдено, %: С 70,94; Н 4,68; N 8,98. С₄₄H₃₇O₇N₅. Вычислено, %: С 70,67; Н 4,98; N 9,36.

5'-О-Монометокситритил-6-N,2'-О,3'-О-трибензоиладенозин (V), выход 1,4 г (22,5%), т. пл. 125–128° С (этилацетат), R_f 0,80 (Б). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 232 (4,67), 280 (4,33). Найдено, %: С 72,22; Н 4,61; N 8,02. $\text{C}_{51}\text{H}_{41}\text{O}_8\text{N}_5$. Вычислено, %: С 71,90; Н 4,85; N 8,22.

6-N,3'-О-Дибензоил-5'-О-монометокситригиладенозин-2'-[2,5-дихлорфенил(*n*-нитрофенилэтил)]фосфат (VI). Смесь 0,19 г (2,75 ммоль) 1,2,4-триазола и 0,39 г (1,39 ммоль) 2,5-дихлорфенилдихлорфосфата в 2,5 мл пиридина перемешивали 10 мин, охладили до 0° С и порциями в течение 5 мин добавили к ней раствор 0,74 г (0,99 ммоль) соединения (III) в 2 мл пиридина, затем перемешивали еще 10 мин. К смеси добавили 0,30 г (1,8 ммоль) 2-(*n*-нитрофенил)этанола и продолжали перемешивание в течение 3 ч. Раствор разбавили хлороформом (70 мл) и промыли фосфатным буфером (рН 7, 2×15 мл) и водой (3×20 мл). Органический слой высушили безводным Na_2SO_4 , упарили, остаток упарили с толуолом и хроматографировали на силикагеле (200 см³). Продукты элюировали хлороформом, затем смесью хлороформ – метанол (40 : 1). Фракции, содержащие соединение (VI), упарили до объема 5 мл и добавили к 200 мл гексана. Осадок отфильтровали, высушили. Получили 1,0 г (89%) триэфира (VI), R_f 0,85 (В). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 229 (4,59), 275 (4,48).

6-N,3'-О-Дибензоил-5'-монометокситригиладенозин-2'-(*n*-нитрофенилэтил)фосфат (VII). Раствор 4,60 г (4,10 ммоль) триэфира (VI) и 7,0 г (42,1 ммоль) *n*-нитробензальдоксима в 250 мл смеси триэтиламин – диоксан – вода (1 : 1 : 1) перемешивали в течение 40 мин, упарили, добавили 50 мл пиридина и снова упарили (операцию повторили трижды), после чего аналогичную процедуру проделали с толуолом (2×50 мл). Остаток хроматографировали на силикагеле (100 см³). Продукты элюировали хлороформом, затем смесью хлороформ – метанол (20 : 1), содержащей 1,5% триэтиламина. Фракции, содержащие соединение (VII), объединили и упарили. Остаток растворили в 15 мл хлороформа и добавили к 600 мл гексана. Осадок отфильтровали, высушили. Получили 4,0 г (90%) диэфира (VII), R_f 0,50 (Г). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 231 (4,63), 277 (4,51).

Аденилил(2' → 5')аденилил(2' → 5')-2',3'-О-(2-карбоксиэтил)этилиденаденозин (XVII). Смесь 0,30 г (0,60 ммоль) нуклеозида (I) и 0,78 г (0,72 ммоль) диэфира (VII) растворили в 6 мл абс. пиридина, добавили 0,49 г (4,32 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола и после его растворения 0,33 г (1,44 ммоль) хинолин-8-сульфохлорида. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем разбавили до 150 мл хлороформом, промыли фосфатным буфером (рН 7) до нейтральной реакции промывных вод, высушили безводным Na_2SO_4 , упарили, остаток упарили с толуолом. Остаток нанесли на колонку с силикагелем (80 см³) и элюировали хлороформом. Получили 0,78 г (88,6%) соединения (XI), R_f 0,78 (А). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 233 (4,71), 280 (4,65).

К 0,78 г (0,54 ммоль) димера (XI) добавили 25 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен – метанол (7 : 3) и выдержали реакционную смесь до полного исчезновения исходного соединения (XI), затем разбавили ее хлороформом (25 мл) и промыли фосфатным буфером (рН 7). Водный слой экстрагировали хлороформом (20 мл), объединенные органические растворы сушили безводным Na_2SO_4 и упарили досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (60 см³), продукты элюировали хлороформом. Получили 0,5 г (78,9%) дитриэтированного динуклеозидмонофосфата (XII), R_f 0,67 (А). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 234 (4,58), 281 (4,66).

К смеси 0,5 г (0,42 ммоль) соединения (XII) и 0,55 г (0,51 ммоль) диэфира (VII) в 4,2 мл пиридина добавили 0,35 г (3,04 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола и 0,23 г (1,01 ммоль) хинолин-8-сульфохлорида. Реакционную смесь выдержали и обработали аналогично описанному в синтезе димера (XI). Получили 0,64 г (70,8%) тринуклеозиддифосфата (XV), R_f 0,71 (А). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$, нм ($\lg \epsilon$): 233 (4,86), 280 (4,81).

Раствор 0,3 г (0,15 ммоль) тримера (XV) в 15 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси хлористый метилен — метанол (7:3) выдержали 20 мин, реакцию смесь разбавили хлороформом до 100 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×50 мл). Органический слой отделили, высушили безводным Na₂SO₄ и упарили досуха. Остаток обработали раствором 0,04 г 1,8-диазабицикло[5,4,0]ундецена-7 в 5,3 мл пиридина в течение 20 ч, добавили 3 мл 1 н. раствора уксусной кислоты в пиридине, раствор упарили и остаток упарили с пиридином (2×30 мл). Остаток растворили в 10 мл насыщенного при 0° С раствора аммиака в метаноле и выдержали 20 ч, затем упарили и обработали 10 мл 0,5 н. раствора NaOH в смеси этанол — вода (1:1) в течение 5 мин. Реакционную смесь разбавили до 100 мл смесью этанол — вода (1:1) и нейтрализовали ионообменной смолой Амберлит IRC (H⁺-форма). Смолу отфильтровали и промыли водой и этанолом. Объединенные фильтрат и промывные воды упарили, остаток хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻-форма, 40 см³), элюировали ТЕАВ (градиент концентраций 0,001→0,8 М). Получили 92 мг (46,8%) тримера (XVII) в виде триэтиламмониевой соли, R_f 0,58 (Ж). УФ-спектр, λ_{макс}^{Н₂О}, нм (lg ε): 260 (4,56).

6-N-Бензоил-3'-дезоксиденозин (IX). К раствору 0,33 г (0,92 ммоль) 6-*N*-бензоил-3'-дезоксиденозина в 5 мл пиридина добавили раствор 0,35 г (1,13 ммоль) монометокситригилхлорида в 5 мл пиридина и перемешивали смесь в течение 20 ч. К реакционной смеси добавили 3 мл метанола, раствор упарили и затем остаток упарили с толуолом, после чего хроматографировали на силикагеле (30 см³), продукты реакции элюировали хлороформом. Получили 0,4 г (69%) соединения (IX), R_f 0,45 (А). УФ-спектр, λ_{макс}^{С₂H₅OH}, нм: 234, 282.

6-N-Бензоил-3'-дезоксиденозин-2'-O-(o-хлорфенил)фосфат (X). Смесь 0,3 г (4,38 ммоль) 1,2,4-триазола, 0,44 г (1,78 ммоль) *o*-хлорфенилдихлорфосфата в 4 мл пиридина перемешивали 10 мин и затем добавили к ней раствор 0,75 г (1,2 ммоль) соединения (IX) в 6 мл пиридина. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, после чего обработали 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃. Экстрагировали хлороформом (3×30 мл), объединенные органические слои промыли водой и высушили безводным Na₂SO₄, упарили, остаток упарили с толуолом, после чего растворили в 10 мл хлороформа и вылили в 150 мл петролейного эфира. Получили 0,9 г (84%) диэфира (X) в виде белого порошка, R_f 0,13 (А).

3'-Дезоксиаденилил(2'→5')-3'-дезоксиденилил(2'→5')-2',3'-O-(2-карбокситил)этилиденаденозин (XVIII). К смеси 0,17 г (0,20 ммоль) диэфира (X) и 0,08 г (0,16 ммоль) нуклеозида (I) в 2 мл пиридина добавили 0,1 г (0,32 ммоль) триизопропилбензолсульфохлаорида и 0,11 г (0,96 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола. Реакционную смесь перемешивали 24 ч, затем разбавили хлороформом до 50 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×30 мл). Органический слой промыли водой, высушили безводным Na₂SO₄, упарили и остаток упарили с толуолом, после чего хроматографировали на силикагеле (40 см³). Продукты реакции элюировали хлороформом, получили 0,18 г (86%) соединения (XIII), R_f 0,72 (Д).

Раствор 0,18 г (0,14 ммоль) димера (XIII) в 5 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол (7:3) выдержали 20 мин, затем реакционную смесь разбавили дихлорэтаном до 20 мл и промыли фосфатным буфером (рН 7; 2×10 мл) и водой. Органический слой высушили безводным Na₂SO₄ и упарили досуха. Получили 0,13 г (91,5%) дитригиллированного динуклеозидмонофосфата (XIV), R_f 0,50 (Д).

Смесь 0,13 г (0,13 ммоль) димера (XIV) и 0,21 г (0,25 ммоль) диэфира (X) в 2 мл пиридина конденсировали в присутствии 0,11 г (0,36 ммоль) триизопропилбензолсульфохлаорида и 0,12 г (1,05 ммоль) 3-нитро-1,2,4-триазола аналогично описанному в синтезе димера (XIII). Получили 0,20 г (87%) тримера (XVI), R_f 0,63 (Д).

Растворили 0,2 г (0,11 ммоль) тримера (XVI) в 6 мл 2% раствора *n*-толуолсульфокислоты в смеси дихлорэтан — метанол (7:3), через 15 мин реакционную смесь разбавили хлороформом до 20 мл и промыли фосфат-

ным буфером (рН 7; 2×15 мл). Органический слой высушили безводным Na₂SO₄ и упарили досуха. К остатку добавили 0,45 г (2,7 ммоль) *n*-нитробензалдоксима и по 6 мл диоксана, триэтиламина и воды и выдержали смесь в течение 2 ч. Раствор упарили, остаток упарили с пиридином, обработали 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровали и растворили в 15 мл насыщенного при 0°С раствора аммиака в метаноле. Раствор выдержали 20 ч и упарили, а остаток обработали 6 мл 0,5 н. раствора NaOH в смеси этанол — вода (1 : 1) в течение 6 мин. Реакционную смесь разбавили водой до 20 мл и нейтрализовали ионообменной смолой дауэкс 50W×12 (H⁺-форма). Смолу отфильтровали, промыли этанолом и водой, остаток хроматографировали на колонке (30 см³) с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻-форма), элюировали ТЕАВ (градиент концентраций 0,001→0,8 М). Получили 65 мг (46%) тримера (XVII) в виде триэтиламмониевой соли, R_f 0,19 (E). УФ-спектр, λ_{макс}^{H₂O}, nm (lg ε): 260 (4,52).

Получение аффинных сорбентов. К раствору 25 мг (0,024 ммоль) тримера (XVII) (литиевая соль) в 4 мл воды добавили 0,5 г АН-сефарозы 4В, предварительно промытой 0,5 М раствором NaCl и водой. После перемешивания в течение 10 мин к суспензии добавили 40 мг (0,21 ммоль) хлоргидрата N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и перемешивали смесь 20 ч. Сорбент отфильтровали, промыли 20 мл 0,1 М раствора NaHCO₃, 20 мл 0,01 М раствора HCl, 20 мл 0,05 М раствора NaCl и водой до отрицательной реакции на ион хлора.

Определение количества связанного лиганда. К 1 мл полученного аффинного сорбента добавили 5 мл 0,5 М раствора HCl, выдержали смесь 15 мин на кипящей водяной бане, раствор охладили и разбавили водой до объема 50 мл. Аналогичным образом гидролизovali 1 мл АН-сефарозы 4В, не содержащей связанного лиганда, и образец тримера (XVII) (0,49 мкмоль). Для полученных растворов измерили поглощения при 260 нм (A₂₆₀) (кювета 1 см), которые составили: для чистой сефарозы A_c 0,48; для аффинного сорбента A_{ac} 1,30; для тримера (XVII) A_t 0,47. Количество связанного лиганда определили по разнице поглощений A_{ac}—A_c=1,30—0,48=0,82, что, с учетом поглощения гидролизата тримера (XVII), составило (0,82·0,49) : 0,47=0,85 мкмоль на 1 мл набухшего геля. В пересчете на сухой сорбент с учетом коэффициента набухания АН-сефарозы 4В в воде, равного 4, количество связанного лиганда составило 0,85·4=3,4 мкмоль на 1 г сухой сефарозы. В случае конденсации 42 мг (0,041 ммоль) тримера (XVIII) с 0,5 г АН-сефарозы 4В, гидролиза сорбентов и 0,41 мкмоль тримера (XVIII) в аналогичных условиях величины поглощения составили: A_c 0,48; A_{ac} 1,65; A_t 0,44, что соответствует 1,39 мкмоль лиганда на 1 мл набухшего геля, или 5,56 мкмоль на 1 г сухого сорбента.

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Немецкому исследовательскому обществу (г. Бонн, ФРГ) и Фонду им. А. фон Гумбольдта (г. Бонн-Бад Годесберг, ФРГ) за частичную финансовую поддержку настоящего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kerr I. M., Brown R. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 1, p. 256—260.
2. Williams B. R. G., Golgher R. R., Kerr I. M. FEBS Lett., 1979, v. 105, № 1, p. 47—52.
3. Baglioni C., Minks M. A., Maroney P. A. Nature (London), 1978, v. 273, № 5664, p. 684—687.
4. Clemens M. J., Williams B. R. G. Cell., 1978, v. 13, № 3, p. 565—572.
5. Slattery F., Ghosh N., Samanta H., Lengyel P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 10, p. 4778—4782.
6. Nilsen T. W., Wood D. L., Baglioni C. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 21, p. 10751—10754.
7. Seela F., Waldek S. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 12, p. 2343—2354.
8. Rosemeyer H., Seela F. Carbohydr. Res., 1978, v. 62, № 1, p. 155—161.
9. Rosemeyer H., Seela F. J. Med. Chem., 1979, v. 22, № 12, p. 1545—1547.
10. Hall R. H. Biochemistry, 1964, v. 3, № 6, p. 769—773.
11. Rosemeyer H. Immobilisierte Ribonucleoside — ihre Synthese und Bioaffinität. Dissertation. Paderborn, 1980. 138 p.
12. Flockerzi D., Silber G., Charubala R., Schlosser W., Varma R. S., Greegan F., Pfleiderer W. Liebigs Ann. Chem., 1981, № 9, p. 1568—1585.

13. Holy A., Soucek M. *Tetrahedron Lett.*, 1971, № 2, p. 185–188.
14. Uhlmann E., Pfeleiderer W. *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, № 13, p. 1181–1184.
15. Reese C. B., Titmas R. C., Yau L. *Tetrahedron Lett.*, 1978, № 30, p. 2727–2730.
16. Charubala R., Pfeleiderer W. *Tetrahedron Lett.*, 1982, v. 23, № 46, p. 4789–4792.
17. Charubala R., Pfeleiderer W. *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, № 42, p. 4077–4080.
18. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 25, p. 7332–7337.

Поступила в редакцию
7.IX.1983

SYNTHESIS OF 2',3'-CYCLIC ACETAL DERIVATIVES OF (2'-5')OLIGOADENYLATES AND AFFINITY SORBENTS ON THEIR BASIS

KVASYUK E. I., KULAK T. I., ZAITSEVA G. V., MIKHAILOPULO I. A.,
PFLEIDERER W.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the
Byelorussian SSR, Minsk; University of Konstanz, Konstanz*

The trimer of (2'-5')-adenylic acid and its 3'-deoxy analogue with (2-carboxyethyl)-ethylidene group in terminating fragment have been synthesized by the phosphotriester approach. The mixtures of quinoline-8-sulfonyl chloride: 3-nitro-1,2,4-triazole and triisopropylbenzenesulfonyl chloride: 3-nitro-1,2,4-triazole were used as condensing agents. The intermediates were purified by silica gel chromatography, and deblocked oligonucleotides were isolated on a DEAE Sephadex A-25. The synthesized trimers were coupled with AH-Sepharose 4B by means of water-soluble carbodiimide. The resultant affinity sorbents had the capacity of 0,86 and 1,39 μmol of the ligand per 1 ml of swollen gel for ribo- and 3'-deoxyribo analogues, respectively.