



УДК 547.963.32.057

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
РИБОНУКЛЕОЗИД-2',3'-ЦИКЛОФОСФАТОВ

Бочаров А. Л.

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

При изучении субстратной специфичности и измерении кинетических параметров дециклизирующих РНКаз [1—4] мы обнаружили, что коммерческие препараты природных рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатов чаще всего непригодны для непосредственного использования в экспериментах, поскольку содержат в большем или меньшем количестве примеси 2'- и 3'-фосфатов нуклеозидов. Наличие таких примесей недопустимо при прецизионных измерениях каталитических параметров, в особенности  $k_M$ . Помимо этих примесей, которые легко выявить хроматографически, в коммерческих препаратах часто содержатся примеси, не поглощающие в УФ-области, но обнаруживающиеся в виде дополнительных, и часто довольно интенсивных, сигналов в спектрах ПМР. Поэтому во всех случаях для использования в экспериментальной работе приходилось подвергать коммерческие препараты тщательной хроматографической очистке. Кроме того, для работы по препаративному ферментативному синтезу рибодинуклеозидмонофосфатов [5] нам требовались большие количества дорогостоящих циклофосфатов. В связи с этим мы разработали удобную универсальную модификацию описанных в литературе методов получения циклофосфатов [6], позволяющую быстро и практически с количественным выходом получать десятки и сотни миллиграммов необходимых 2',3'-циклофосфатов из синтезированных нами [2] и из достаточно дешевых коммерческих природных рибонуклеозид-2'(3)'-фосфатов.

Водный раствор (здесь и всюду далее использована деионизованная вода) любой доступной соли рибонуклеозид-2'(3)'-фосфата пропускали через колонку с Dowex 50  $\times$  4 ( $H^+$ ) в воде (10 мл смолы на 400 мг исходного вещества) до отсутствия поглощения в элюате. Элюат нейтрализовали добавлением 0,6 мл (2,5 ммоль) трибутиламина и упаривали раствор до суха в вакууме. Полученное масло растворяли в 25 мл метанола (может быть использован коммерческий метанол без дополнительной очистки, так же как и все остальные указанные ниже растворители) и к раствору добавляли 1,6 г  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида. Раствор оставляли при 22—24° С на 16—18 ч. Прозрачный раствор упаривали и растворяли в смеси 200 мл  $H_2O$  — 200 мл хлороформа. Водную фазу экстрагировали хлороформом (2  $\times$  100 мл) и 200 мл эфира. Водную фазу наносили на колонку (3,8  $\times$  12 см) DEAE-целлюлозы ( $HCO_3^-$ ), колонку промывали 200—300 мл 0,01 М  $NH_4HCO_3$  (элюция поглощающих примесей нуклеотидной природы) и элюировали нуклеозид-2',3'-циклофосфат 0,04—0,06 М  $NH_4HCO_3$  (0,04 М для цитозинового и аденинового и 0,06 М для урацильного и гуанинового производных). Элюат упаривали в вакууме водоструйного насоса при 40° С и  $NH_4HCO_3$  удаляли многократным переупариванием с водой (до отсутствия аммиачного запаха в колбе). Вещество подвергали лиофилизации из водного раствора. Полученные таким способом аммониевые соли циклофосфатов были хроматографически гомогенными, и в спектрах ПМР не наблюдалось дополнительных сигналов. Уширение сигналов в спектрах ПМР связано или с качеством используемой в хроматографических операциях воды, или с качеством коммерческого  $NH_4HCO_3$  (примеси двухвалентных металлов, поскольку уширение сигналов устраняется при добавлении ЭДТА). В таком случае перед лиофилизацией требуется

дополнительная операция — пропускание аммониевой соли циклофосфата через колонку с Dowex 50  $\times$  4 ( $\text{NH}_4^+$ ). Препараты достаточно стабильны при хранении на холоде, и в течение 2—3 мес не наблюдалось появления продуктов неферментативного гидролиза.

В литературе было отмечено, что наиболее лабильным из циклофосфатов является гуанозин-2',3'-циклофосфат [6]. Наш опыт подтвердил это наблюдение. Мы обнаружили, однако, что литиевая соль этого циклофосфата достаточно стабильна в течение 2—3 мес хранения, и предлагаем простую процедуру ее получения. После удаления из препарата циклофосфата избытка  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (см. выше) вещество растворяли в 100 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и к раствору добавляли 0,25 мл (1,05 ммоль) трибутиламина. Раствор упаривали и растворяли в 50 мл метанола. К раствору добавляли 0,25 мл (1,25 ммоль) 5 М  $\text{LiCl}$  и затем литиевую соль гуанозин-2',3'-циклофосфата осаждали добавлением 500 мл ацетона. После стояния на холоде большую часть надосадочной жидкости удаляли декантацией и остаток промывали эфиром (стеклянный фильтр G4 (ГДР) или центрифугирование при 3000 об/мин на центрифуге К-23 (ГДР)). Вещество сушили в вакуум-эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Этим способом получали литиевые соли и остальных циклофосфатов. При замене  $\text{LiCl}$  на  $\text{NaI}$  или  $\text{KI}$  получали соответственно натриевые или калиевые соли.

Наш опыт показал, что описанный метод получения рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатов достаточно универсален и прост и в течение 3—4 сут с его помощью можно наработать сотни миллиграммов необходимых для работы чистых продуктов.

Выражаю благодарность проф. М. Я. Карпейскому за постоянный интерес и поддержку в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеев Г. П., Бочаров А. Л., Мамаева О. К., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1197—1206.
2. Карпейский М. Я., Моисеев Г. П., Бочаров А. Л., Богданова Г. А., Михайлов С. Н., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 803—814.
3. Яковлев Г. И., Моисеев Г. П., Бочаров А. Л., Михайлов С. Н., Карпейский М. Я. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 2, с. 195—203.
4. Yakovlev G. I., Bocharov A. L., Moiseyev G. P. FEBS Lett., 1984, v. 175, № 2, p. 356—358.
5. Бочаров А. Л. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1127—1128.
6. Shugar D. Meth. Enzymol., 1967, v. XII, Part A, p. 131—137.

Поступило в редакцию  
4.III.1986

#### A MODIFIED UNIVERSAL PROCEDURE FOR THE SYNTHESIS OF RIBONUCLEOSIDE 2',3'-CYCLOPHOSPHATES

BOCHAROV A. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

[A universal modification of methods described in the literature is proposed for the synthesis of ribonucleoside 2', 3'-cyclophosphates. The procedure is facile and allows one to synthesize hundreds of milligrams of pure products in a short time. The method can easily be scaled up.