



УДК 546.113 + 577.113.3

© 1991 г.

Ю. Л. Каминский, Л. А. Яковлева, О. П. Козырева,  
В. А. Бабаин, Н. В. Тарусова\*, М. В. Ясько\*,  
С. Г. Розенберг\*\*

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 2'-ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФИТОВ,  
МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ В ФОСФИТНОМ ОСТАТКЕ

Радиовый институт им. В. Г. Хлопина, Ленинград;

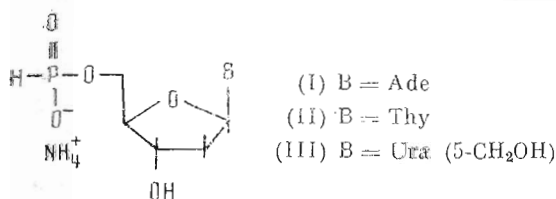
\*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;

\*\*Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Изучен жидкофазный и твердофазный  $^1\text{H} - ^3\text{H}$ -обмен в 5'-фосфитах тимидина, 2'-дезоксиаденозина, 2'-дезоксис-5-гидрокси-метилуридина. Найдены условия получения меченных тритием фосфитов нуклеозидов. Методом  $^3\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии и данными гидролиза показано, что тритий содержится практически полностью в Р-Н-группе фосфитов. Полученные [ $^3\text{H}$ ]фосфиты при рН 2-10 устойчивы к гидролизу при 20° С, а при рН 10 устойчивы в течение 2 ч при 100° С; при этом они не вступают в реакцию изотопного обмена с водой. В то же время в условиях обмена в присутствии падающего катализатора наблюдается гидролиз фосфитов, сильно зависящий от рН среды.

Известно, что 5'-фосфиты 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов, аналоги 5'-фосфатов нуклеозидов, ингибируют репродукцию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV), проявляя в ряде случаев большую эффективность и более низкую токсичность, чем соответствующие нуклеозиды [1]. В связи с этим представляет интерес исследование превращений производных такого типа в клетках и механизма подавления вируса. Проблема эта достаточно сложна и требует использования меченых модельных соединений, 5'-фосфитов модифицированных и природных нуклеозидов с локализацией метки в различных фрагментах молекул. Задача синтеза меченых 5'-фосфитов нуклеозидов усложняется по сравнению с задачей введения метки в нуклеозиды в связи с лабильностью остатка фосфористой кислоты и требует специальных разработок.

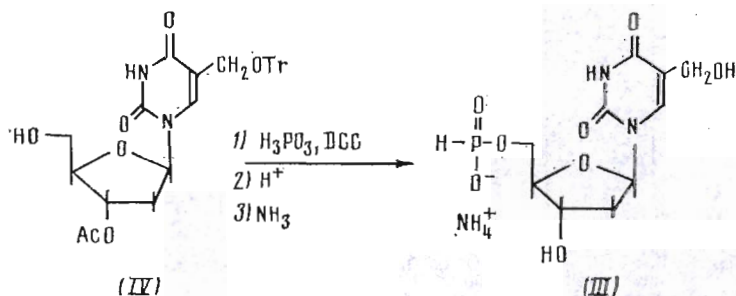
Целью настоящей работы было изучение возможностей введения тритиевой метки с помощью реакций каталитического изотопного обмена в 5'-фосфиты 2'-дезоксинуклеозидов на примере производных 2'-дезоксиаденозина (I), тимидина (II) и 2'-дезоксис-5-гидрокси-метилуридина (III).



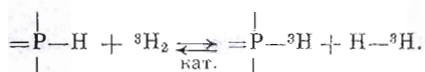
Синтез соединений (I) и (II) был описан в работе [2]. Мы синтезировали эти соединения по модифицированной методике, где в качестве конденсирующего агента был использован доступный N,N'-дидицилогексилкарбодиймид (DCC), а реакция конденсации нуклеозидов с фосфористой кислотой проводилась при пониженной температуре, что позволило повысить селективность реакции по 5'-ОН-группе.

Возможность восстановления 5'-фосфита 5-гидрокси-метил-2'-дезоксимуридина (III) до 5'-фосфата тимидина не была ранее исследована, в то вре-

мя как условия восстановления 5-гидроксиметил-2'-дезоксигуанидина тритием до [<sup>3</sup>H]тимидина известны [3, 4]. В синтезе производного (III) был использован 3'-О-ацетил-2'-дезоксигуанидин (IV), полученный из 3',5'-О-диацетил-2'-дезоксигуанидина [5] в несколько стадий, включая тритирование гидроксиметильной группы, деацетилирование, введение *трет*-бутилдиметилсилильной защиты по 5'-гидроксилу, 3'-О-ацетилирование и удаление силильной защиты. Синтез 5'-фосфита (III) из соединения (IV) приведен на схеме.



Реакция введения тритиевой метки может быть представлена в общем виде уравнением



Нами исследован изотопный обмен водорода на тритий в 5'-фосфитах нуклеозидов (I) и (II) в различных условиях. Так, при жидкофазном обмене, проведенном по методике Эванса [6], вещества перемешивали с катализаторами в буферном растворе в атмосфере трития или тритий-водородной смеси. Варьировались типы буферов и катализаторов. В присутствии некоторых катализаторов наблюдался гидролиз фосфитаэфирной связи. Смесь продуктов реакции анализировали при помощи ТСХ (табл. 1). Родий на окиси алюминия и платина на карбонате кальция не обеспечивали обмен. Использование окиси палладия на сульфате бария приводило к гидролизу до нуклеозида и фосфористой кислоты (опыт 4 табл. 1). Эффективным катализатором обмена оказался 0,5% палладий на сульфате бария, причем в процессе обмена отщепление фосфористой кислоты было незначительным.

В оптимальных условиях (опыты 5 и 8 табл. 1) в двух повторях для каждого опыта были получены: из соединения (I) — меченое производное (<sup>3</sup>H]-I) с молярной активностью ( $A_{\text{мол}}$ ) 814 и 925 ТБк/моль (22 и 25 кКи/моль), а из соединения (II) — тритиевое производное (<sup>3</sup>H]-II) с  $A_{\text{мол}}$  962 и 999 ТБк/моль (26 и 27 кКи/моль). Выходы составляли 25—30%, радиохимическая чистота — 97—100%. Соединение (<sup>3</sup>H]-I) было также получено твердофазным изотопным обменом: соединение (I) наносили на катализатор (Pd/BaSO<sub>4</sub>, 5%), высушивали и проводили обмен с газообразным тритием при 100° С.  $A_{\text{мол}}$  полученного таким образом соединения (<sup>3</sup>H]-I) имела ту же величину, что и для производного, полученного в оптимальных условиях жидкофазного обмена, но выход был ниже (3—5%).

Расположение метки в фосфитах (<sup>3</sup>H]-I) и (<sup>3</sup>H]-II) было установлено при помощи <sup>3</sup>H-ЯМР-спектроскопии. <sup>3</sup>H-ЯМР-спектр соединения (<sup>3</sup>H]-I) содержал только дублет с  $J$  678,4 Гц, спектр вещества (<sup>3</sup>H]-II) — только дублет с  $J$  676,6 Гц (табл. 2). Сопоставление данных спектров <sup>3</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР меченных тритием 5'-фосфитов нуклеозидов и спектров <sup>31</sup>P-ЯМР немеченных соединений однозначно показало, что тритий содержится только в Р—Н-связи. Отсутствие трития в положении 8 аденина в соединении (<sup>3</sup>H]-I) — неожиданный результат, поскольку обмен водорода на тритий в этом положении проходит в соответствующем нуклеозиде, а также осуществлен в близких условиях реакции для 5'-фосфата дезоксиаденозина

## Жидкофазный каталитический обмен водорода в 5'-фосфитах 2'-дезоксинуклеозидов

Опыт	5'-Фосфит	Катализатор <sup>2*</sup>	Растворитель <sup>3*</sup>	Условия реакции		Распределение радиоактивности в смеси продуктов реакции обмена, % <sup>3*</sup>			
				время, ч	давление газа, атм	5'-фосфит нуклеозида	нуклеозид <sup>4*</sup>	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> ·NH <sub>3</sub>	
1	I	A	D	2,5	1	17	58	25	
2		A	E	2	1	41	34	25	
3		A	F	F	2	1	27	39	34
4		B	E	E	2	1	—	90	10
5		C	E	E	2	0,5	76	8	16
6	II	C	E	2	0,5	—	—	100	
7		C	E	0,5	0,5	30	—	70	
8		C	D	D	0,5	0,5	95	—	5
9	III	C	E	2	0,5	20	30	50	

\* A — 50% Pd/BaSO<sub>4</sub>; B — 10% PdO/BaSO<sub>4</sub>; C — 0,5% Pd/BaSO<sub>4</sub>.

\*\* D — 0,05 М карбонат-гидрокарбонатный буфер, pH 10; E — 0,1 М фосфатный буфер, pH 7; F — 0,1 М фосфатный буфер, pH 7.

\*\*\* Данные получены из радиохроматографического анализа после разделения продуктов реакции при помощи ТСХ в системах 1 и 2.

\*\*\*\* Проверка означает, что в смеси присутствует немеченый тимидин.

Таблица 2

## Данные ЯМР-спектров 5'-фосфитов 2'-дезоксинуклеозидов\*

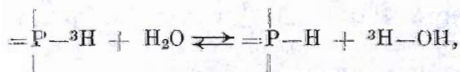
5'-Фосфит	Константы спин-спинового взаимодействия, Гц (±0,15 Гц)				Изотопный сдвиг <sup>31</sup> P на <sup>31</sup> N, м.д.
	<sup>1</sup> J <sub>P-N</sub>	<sup>3</sup> J <sub>P-N</sub>	<sup>1</sup> J <sub>P-N</sub>	<sup>1</sup> J <sub>P-N</sub>	
Тимидина 2'-Дезоксиаденозина	637,4	6,7	1,1	676,6 ** 678,4	0,22±0,02

\* Спектры сняты на приборе Bruker AC-250.

\*\* <sup>1</sup>J<sub>P-N</sub><sup>теор</sup> 679,8 Гц (<sup>1</sup>J<sub>P-N</sub> 1,0666).

[6]. Как уже упоминалось (см. данные табл. 1, опыты 1—5), при проведении обмена для соединения (I) наряду с (<sup>3</sup>H)-I образовывался и меченный тритием 2'-дезоксиаденозин. Образование меченого нуклеозида, по-видимому, является результатом гидролитического расщепления исходного фосфита.

Исследована стабильность тритиевой метки в соединениях (<sup>3</sup>H)-I и (<sup>3</sup>H)-II в условиях гомогенного обмена в водных растворах по уравнению



а также устойчивость меченых соединений к гидролизу с расщеплением гликозидной и фосфитэфирной связей. Известно, что гомогенный обмен водорода P-H-связи в H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> и диалкилфосфитах с водой практически отсутствует в нейтральной среде, но может проходить при низких значениях pH [7—9].

Меченые 5'-фосфиты (<sup>3</sup>H)-I и (<sup>3</sup>H)-II при хранении в водно-спиртовых растворах (1 : 1 по объему) при —5 — 0° С в течение 2 мес проявляли достаточно высокую устойчивость. Радиохимическая чистота веществ оставалась неизменной, A<sub>мол</sub> снижалась не более чем на 5%. Хранение в тех же условиях в течение 6 мес приводило к снижению радиохимической чистоты и A<sub>мол</sub> приблизительно на 15%. При выдерживании соединения

( $^3\text{H}$ -I) при комнатной температуре в течение 24 ч в растворах с различным значением рН (7 у 0,07 М фосфатного буфера, 10 у 0,05 М карбонат-гидрокарбонатного буфера, 2 у 0,01 н.  $\text{HCl}$ ) величина  $A_{\text{мол}}$  не изменялась; не было также обнаружено продуктов гидролиза — 2'-дезоксадеозина и аденина. Гидролиз не проходил также при нагревании вещества в растворе с рН 10 при 100° С в течение 2 ч.

Гидролиз соединения ( $^3\text{H}$ -I) 0,1 н.  $\text{HCl}$  при 100° С в течение 2,5 ч приводил к аденину, а в случае ( $^3\text{H}$ -II) — к тимидину. Радиоактивность аденина составляла 2,5% от исходной, а тимидин тритиевой метки не содержал. Это стало дополнительным подтверждением того, что тритиевая метка содержится только в группе Р—Н фосфитов.

Поскольку получить меченный тритием по основанию 5'-фосфит тимидина прямым обменом не удалось, была сделана попытка получить его восстановлением 5'-фосфита 2'-деокси-5-гидрокси-5-метилуридина (III). Известно, что соответствующий нуклеозид восстанавливали до тимидина в 50% уксусной кислоте [3] или смеси диоксан — ледяная уксусная кислота [4]. Однако соединение (III) в этих условиях в присутствии катализаторов гидролизовалось до нуклеозида. В ледяной уксусной кислоте и диметоксиэтаноле восстановления не наблюдалось. При перемешивании вещества (III) в буфере с рН 7 с 0,5%  $\text{Pd}/\text{BaSO}_4$  в атмосфере тритий-водородной смеси был получен меченный по фосфиту ( $^3\text{H}$ -III). Реакция сопровождалась значительным гидролизом до нуклеозида, содержащего метку (см. табл. 1). В условиях твердофазного обмена на 5%  $\text{Pd}/\text{BaSO}_4$  при 100° С также происходит образование ( $^3\text{H}$ -III) из исходного соединения (III) с низким выходом, при этом обнаружена примесь меченого тимидина.

Таким образом, гетерогенный обмен водорода при атоме фосфора в 5'-фосфитах 2'-деоксинуклеозидов на тритий с газообразным тритием в условиях как жидкофазного, так и твердофазного обмена может быть осуществлен с использованием палладиевого катализатора в нейтральных и щелочных условиях. Тритиевая метка локализована в Р—Н-группе, обмена водорода на тритий в нуклеиновых основаниях 5'-фосфитов нуклеозидов не наблюдается. Тритиевая метка в фосфитах нуклеозидов стабильна в водных растворах при довольно широком диапазоне значений рН. Меченые 5'-фосфиты 2'-деоксинуклеозидов достаточно устойчивы к гидролизу, что дает возможность использовать их для исследования их метаболических превращений в клетках.

### Экспериментальная часть

В синтезах использовали тимидин и 2'-дезоксадеозин (Fluka, Швейцария). ТСХ полученных соединений проводили на пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (Kavalier, ЧСФР) и Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ). Системы растворителей: изопропанол — этанол — 25% аммиак — вода, 60 : 20 : 20 : 1 (1); изопропанол — 25% аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (2); хлороформ — этанол, 9 : 1 (3). Для ионообменной хроматографии применяли DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS M-40 и СФ-46. Радиоактивность растворов измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного метода [10]; радиоактивность веществ на хроматограммах измеряли на сканирующем сцинтилляционном счетчике [11]. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР растворов образцов в  $\text{D}_2\text{O}$  регистрировали на спектрометре Varian XL-100-15 с рабочей частотой 100 МГц, а спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР — на спектрометре Bruker AC-250 с рабочими частотами 250,13; 266,8; 101,256 МГц соответственно.

3'-О-Ацетил-2'-деокси-5-триметилосиметилуридин (IV) синтезировали из 3',5'-ди-О-ацетил-2'-деокси-5-гидрокси-5-метилуридина [5]. Общий выход 29%,  $R_f$  0,27 (система 3). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  265,8 нм ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , рН 7).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр в  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$ , м. д.): 2,13 с, 3H (Ac), 2,40м, 2H (H-2'), 3,82м, 2H (H-5'), 4,00с, 2H ( $\text{CH}_2$ -5), 4,14м, 1H (H-4'), 5,33м, 1H (H-3'), 6,27т, J 7 Гц, 1H (H-1'), 7,19—7,53м, 15H (Tr), 7,85с, 1H (H-6).

Общая методика синтеза 5'-фосфитов нуклеозидов. К раствору 1 ммоль 2'-дезоксинаденозина, тимидина или защищенного 2'-дезоксиметилуридина (IV) в 5 мл абсолютного пиридина добавляли 1,2 ммоль монотрибутиламмониевой соли  $\text{H}_3\text{PO}_3$  в 10 мл пиридина и 290 мг (1,4 ммоль)  $\text{N,N}'$ -дипиклогексилкарбодиимида, перемешивали 24 ч при 4° С. Осадок отделяли, к фильтрату добавляли 30 мл воды, экстрагировали хлороформом, водный слой упаривали. Остаток, содержащий соединение (I) или (II), растворяли в 300 мл воды, доводили pH до 7,5 водным аммиаком, фильтровали и наносили на колонку с DE-32 ( $\text{HCO}_3^-$ -форма, 200 мл), колонку промывали 300 мл воды. Элюировали линейным градиентом  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0—0,2 М), общий объем 2 л. УФ-поглощающие фракции элюата (при концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,05 М) упаривали досуха, а затем 2—3 раза упаривали с водой и этанолом до удаления  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , остаток лиофилизировали. Выходы соединений (I) и (II) составили 40—42%, их характеристики соответствовали данным работы [2].

5'-Фосфит соединения (IV) детритилировали в 50 мл дихлорэтана, содержащего 3 мл трифторуксусной кислоты, в течение 6 ч при 20° С, упаривали, дополнительно упаривали с 50 мл толуола, остаток растворяли в 20 мл 25% водного аммиака, через 12 ч раствор упаривали досуха. Очистку на DE-32 проводили аналогично процедуре для соединений (I), (II). Выход фосфита (III), считая на (IV), составил 75%,  $R_f$  0,4 (система 2). УФ-спектр ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7):  $\lambda_{\text{max}}$  264,6 нм.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): 2,50м, 2H (H-2'), 4,27м, 3H (H-4', 2H-5'), 4,54д,  $J$  0,5 Гц, 2H (CH<sub>2</sub>-5), 4,71м, 2H (H-3'), 6,46т,  $J$  6,6 Гц, 1H (H-1'), 6,91д,  $J$  630,5 Гц, 1H (H-P), 8,04с 1H (H-6).

Жидкофазный обмен проводили в условиях, аналогичных описанным в работе [6]. Раствор 5 ммоль 5'-фосфита нуклеозида, 15 мг катализатора в 0,5 мл буфера перемешивали при 20° С в атмосфере трития или тритий-водородной смеси. Катализатор удаляли фильтрацией, лабильный тритий удаляли упариванием с водой, продукты реакции разделяли при помощи ТСХ в системах 1 и 2.

Твердофазный обмен. Раствор 5 ммоль 5'-фосфита нуклеозида в виде натриевой соли в 0,5 мл воды наносили на 100 мг катализатора порциями по 0,2 мл, воду удаляли упариванием с этанолом (2 × 0,2 мл) и выдерживали в атмосфере тритий-водородной смеси (давление 0,5—1 атм) при 100° С в течение 1 ч. Продукты реакции разделяли при помощи ТСХ (системы 1 и 2). Данные по распределению радиоактивности получены из радиохроматографического анализа при помощи сканирующего сцинтилляционного счетчика.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарусова Н. Б., Хорлин А. А., Краевский А. А., Корнеева М. Н., Носик Д. Н., Круляков И. В., Галегов Г. А., Бибилашвили Р. Ш. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716—1724.
2. Chen J. T., Bencovic C. Y. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 11. P. 3737—3751.
3. Cline R. E., Fink R. M., Fink K. // J. Amer. Chem. Soc. 1959. V. 51. № 8. P. 2521.
4. Viswanathan K. V., Garana A. U., Lakshmy R., Sarkar R. R. // Proc. of the Chem. Sympos. V. 1. Aligarh Muslim University. Aligarh. December 21—23. 1972. P. 85—88.
5. Boerwolf D., Langen P. // Nucl. Acid. Chem. / Eds L. B. Townsend, R. S. Tipson. N. Y. 1978. V. 2. P. 359—366.
6. Evans E. A., Shepard H. C., Turner J. C., Warrell D. C. // J. Labell. Comp. 1974. V. 10. № 4. P. 569—587.
7. Бродский А. И., Сулима Л. В. // Докл. АН СССР. 1952. Т. 85. № 6. С. 1277—1280.
8. Попровская М. Ю., Шумянцева В. В., Лесник Е. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1990. № 9. С. 1966—1969.
9. Luz Z., Silver B. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. № 11. P. 4518—4521.
10. Рысьев О. А., Жарков А. В., Долгирев Е. И. Сцинтилляционный метод измерения трития в биологии и медицине. М.: Атомиздат, 1970.
11. Куделин Б. К., Сузов Н. А. // Радиохимия. 1986. Т. 25. № 11. С. 146—148.

Поступила в редакцию  
29.1.1991

После доработки  
12.V.1991

Yu. L. KAMINSKY, L. A. YAKOVLEVA, O. I. KOZYREVA, V. A. BABAIN,  
N. B. TARUSOVA \*, M. V. YASKO \*, S. G. ROSENBERG \*\*

**SYNTHESIS AND PROPERTIES OF 2'-DEOXYNUCLEOSIDE  
5'-PHOSPHITES LABELLED BY TRITIUM IN THE PHOSPHITE GROUP**

*V. G. Khlopin Radium Institute, Leningrad;  
V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow;  
\*\*Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

Liquid-phase and solid-phase heterogeneous isotopic exchange of gaseous tritium with hydrogen in thymidine 5'-phosphite, 2'-deoxyadenosine 5'-phosphite and 2'-deoxy-5-oxymethyluridine 5'-phosphite has been studied. The exchange reactions are catalysed by palladium on barium sulfate.

It was shown by  $^3\text{H}$  NMR and hydrolysis data that tritium is localized completely in the phosphite P—H group.

The [ $^3\text{H}$ ]phosphites are hydrolytically stable at 20° C within the pH range 2 to 10 and within 2 h at pH 10 and 100° C; no isotope exchange with water was observed under these conditions.