



УДК 547.963.32

УЛУЧШЕННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЗАЩИЩЕННЫХ
ПО АМИНОГРУППЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ОСНОВАНИЯ
НУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТОВ

Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Разработана удобная модификация общепринятого метода синтеза N⁴-бензоил-2'-дезокситидина, N⁶-бензоил-2'-деоксиаденозина, N², 3'-O-диацетил- и N²-ацетил-2'-деоксигуанозина. Методика применима к рибонуклеотидам. Строение полученных соединений охарактеризовано спектрами ПМР. Изучена кинетика сольволиза N-ацильных защитных групп как в условиях селективного деблокирования 3'-ОН, так и в условиях полного удаления защитных группировок.

Химические реакции нуклеотидов, в частности олигонуклеотидный синтез, в большинстве случаев сопряжены с предварительной защитой аминогрупп таких нуклеиновых оснований, как аденин, гуанин и цитозин [1, 2]. В связи с этим особо важное значение имеет выбор защитных групп и разработка удобных методик введения и удаления этих групп. Существующие в настоящее время методы не всегда обеспечивают достаточную экспериментальную простоту, высокие выходы и требуемую чистоту получаемых соединений. В частности, в случае аденозина и цитозина достаточно сложной проблемой является удаление избытка ароматической кислоты, а в случае гуанозина — преодоление низкой растворимости нуклеотида и низкой реакционной способности 2-NH₂-группы [4].

Данное сообщение посвящено описанию удобных препаративных методов синтеза защищенных по аминогруппе гетероциклического основания производных нуклеозид-5'-фосфатов и уточнению условий удаления этих защитных группировок. Были выбраны традиционные ацильные защитные группы: бензоильная в случае цитозиновой и адениновой аминогрупп и ацетильная — для 2-NH₂-группы гуанинового основания. Подобный выбор определялся тем, что предложенные в последние годы новые защитные группировки при ряде недостатков имеют единственное преимущество перед традиционными, заключающееся в их «новизне».

Настоящее исследование не является принципиально новым, но лишь модификацией уже известных методик с целью повышения выхода и чистоты конечных продуктов.

Бензоилирование 2'-дезокситидин-5'-фосфата и 2'-деоксиаденозин-5'-фосфата проводили большим избытком бензоилхлорида. Реакционную смесь обрабатывали абсолютным спиртом и избыток бензоилхлорида, превращенный таким образом в этилбензоат, после разбавления реакционной смеси водой удаляли экстракцией эфиром. Продукт реакции затем экстрагировали, как обычно, хлороформом. Объединенные хлороформные экстр-

ракты промывали водой и упаривали досуха. Для удаления бензоильной группы с 3'-ОН и фосфата использовали гидроокись лития. После нейтрализации соляной кислотой раствор упаривали в вакууме досуха и остаток промывали многократно абсолютным спиртом. При этом удается полностью удалить и хлористый и бензойнохлористый литий. Кроме того, в спирте растворяются окрашенные побочные продукты, которые всегда образуются при бензоилировании коммерческих образцов нуклеотидов. Литиевые соли N-бензоилнуклеотидов с помощью дауэкса-50 (пиридиниевая форма) переводили затем в пиридиниевые.

Описанная методика без каких-либо модификаций пригодна и для защиты аминогруппы рибонуклеозид-5'-фосфатов.

Для улучшения растворимости 2'-дезоксигуанозин-5'-фосфата к реакционной смеси добавляли гексаметилфосфотриамид. При этом реакция ацетилирования заканчивается за 16--20 ч при 20°. Селективное удаление O-ацетильной группы также осуществляли действием 1 н. раствора гидроокиси лития.

Спектрофотометрически была изучена кинетика сольволиза защитных группировок в условиях селективного деблокирования гидроксильных групп (1 н. LiOH, 22°, рис. 1) и полного удаления защитных групп (полунасыщенный при 0° метанольный раствор аммиака, 22°, рис. 2). Результаты исследования представлены в табл. 1. Строение полученных соединений доказано спектрами ПМР (табл. 2).

Выходы N-защищенных нуклеотидов, получаемых по предлагаемой модификации, не превышают выходов «классической» методики. Однако полученные соединения, как показывают спектры ПМР и данные хромато-

Таблица 1

Кинетика гидролиза N-ацильных групп защищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов в условиях селективного и полного деблокирования

Условия	pdC ^{bz}	pdC ^{bz}	pdA ^{bz}	pdA ^{bz}	pdG ^{ac}	pdG ^{ac}
	EtOH—2н. LiOH (1:1)	NH ₃ —MeOH	EtOH—2н. LiOH (1:1)	NH ₃ —MeOH	EtOH—2н. LiOH (1:1)	NH ₃ —MeOH
k, мин ⁻¹	4,8·10 ⁻³	1,9·10 ⁻²	4,9·10 ⁻⁴	1,3·10 ⁻²	1,0·10 ⁻²	5,6·10 ⁻³
t _{1/2} , мин	144	36	1400	55	80	123
t _{95%} , мин		155		238		530
Гидролиз N-ацильной группы за 15 мин, %	6		1		6,5 *	

* Процент гидролиза N²-Ac-группы pdG^{ac} за 7 мин.

Таблица 2

Спектры ПМР N-защищенных производных 2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов

Соединение	δ, м.д. (J, Гц)				
	6-Н или 8-Н	5-Н или 2-Н	1'-Н	2'-Н и 2''-Н	Остальные сигналы
pdC	7,97 (7,6)	6,09	6,29 (6,5)	2,3	4'-Н, 4,31; 5'-Н, 4,04
pdC ^{bz}	8,25 (7,5)	7,25 (7,5)	6,08 (6,3)	2,05	N ⁴ -Bz, 7,30-7,75
pdA	8,45	8,07	6,37 (6,5)	2,64	4'-Н, 4,23; 5'-Н, 3,89
pdA ^{bz}	8,49	8,38	6,34 (7,0)	2,58	Π ⁶ -Bz, 7,08-7,70
pdG	8,04		6,22 (6,8)	2,58	4'-Н, 4,17; 5'-Н, 3,99
pdG ^{ac}	8,26		6,38 (9,8 и 8,1)	2,68 и 2,92	N ² -Ac, 2,26; 3'-O-Ac, 2,18; 3'-Н, 5,50
pdG ^{ac}	8,22		6,26 (6,8)	2,58	N ² -Ac, 2,26

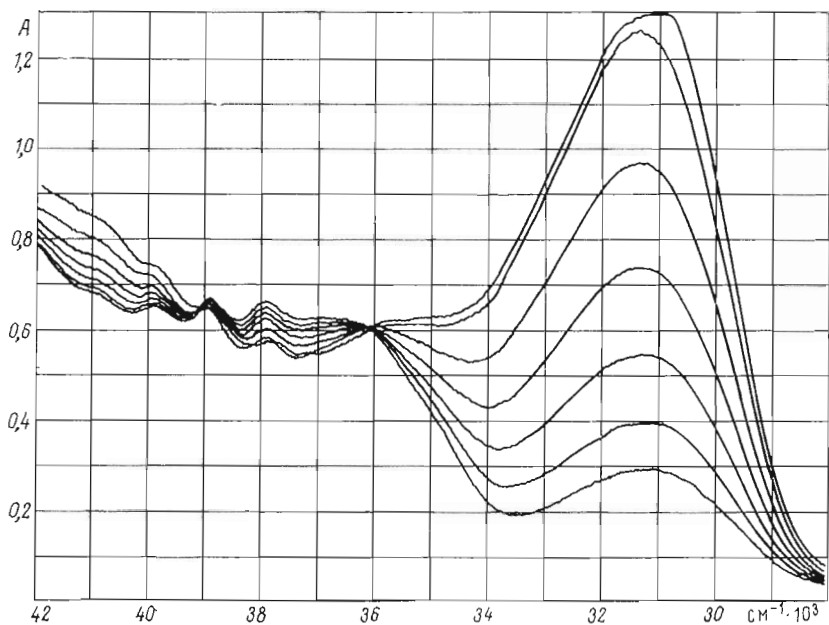


Рис. 1. Гидролиз N-бензильной группы pA^{bz} 1 н. LiOH (50% водный спирт) при 22° (в длинноволновом максимуме поглощения сверху вниз — через 10, 30, 90, 150, 210, 270 и 330 мин от начала реакции)

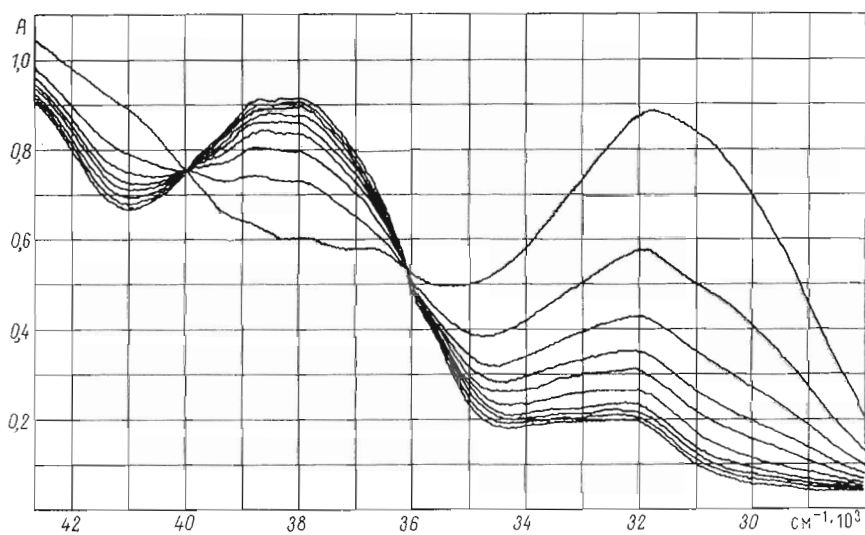


Рис. 2. Аммонолиз N-бензильной группы pA^{bz} полунасыщенным при 0° метанолическим аммиаком при 220° (в длинноволновом максимуме поглощения сверху вниз — через 5, 35, 65, 95, 125, 185, 275, 380, 530 и 800 мин от начала реакции)

графии, полностью свободны от примеси исходного нуклеотида и бензойной кислоты. Кроме того, описанная методика позволяет работать с большими количествами нуклеотидов, получая N-защищенные производные в виде удобных для хранения литиевых солей.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР сняты на спектрометре XL-100-15¹ Varian (США). Химические сдвиги приведены в шкале δ . УФ-спектры записывали на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР).

*N*⁴-Бензоил-2'-дезоксцитидин-5'-фосфат и *N*⁶-бензоил-2'-дезоксаденозин-5'-фосфат. К суспензии 10 ммоль нуклеозид-5'-фосфата (свободная кислота или пиридиновая соль) в 100 мл абс. пиридина добавляли 11,5 мл (100 ммоль) бензоилхлорида и смесь перемешивали 2 ч при 20°. При охлаждении медленно приливали 30 мл абс. спирта и перемешивали еще 2 ч. Полученный раствор разбавляли 400 мл воды и промывали эфиром. Водный слой затем экстрагировали хлороформом (3 × 200 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывали водой, сушили Na₂SO₄ и упаривали в вакууме досуха. К остатку приливали 100 мл спирта и затем 100 мл 2 н. LiOH. Смесь встряхивали до растворения и выдерживали при 20° (всего 15 мин). После добавления 80 мл 2 н. HCl pH раствора доводили до 7,2—7,5. Полученный раствор упаривали в вакууме досуха, остаток размешивали с 100 мл абс. спирта и центрифугировали. Эту операцию повторяли еще три раза. Осадок растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с дауэксом-50 (пиридиновая форма, 30 мл). Вещество элюировали 200 мл 10% водного пиридина. Раствор упаривали до небольшого объема и лиофилизировали. Выход 65—70%, считая на нуклеотид.

*N*²,3'-О-Диацетил-2'-дезоксигуанозин-5'-фосфат. Суспензию 10 ммоль 2'-дезоксигуанозин-5'-фосфата (пиридиновая соль) в смеси 100 мл абс. пиридина, 100 мл ацетангирида и 100 мл гексаметилфосфотриамида перемешивали до полного растворения соли (16—20 ч). Светло-розовый раствор упаривали в вакууме при 40° досуха и трижды с 50 мл абс. пиридина. Остаток размешивали с 500 мл абс. эфира и смесь оставляли на 1 ч при 0°. Осадок отфильтровывали, тщательно промывали на фильтре абс. эфиром, растворяли в 100 мл 50% водного пиридина и раствор выдерживали 2 ч при 20°. Полученный раствор упаривали до небольшого объема и лиофилизировали. Выход 90—95%.

*N*²-Ацетил-2'-дезоксигуанозин-5'-фосфат. Раствор 10 ммоль *N*²,3'-О-диацетилгуанозин-5'-фосфата (пиридиновая соль) в 100 мл 1 н. LiOH выдерживали при 20° ровно 7 мин и затем добавляли 40 мл 2 н. HCl. Доводили pH раствора до 7,2—7,5 и упаривали в вакууме досуха. Остаток размешивали с 100 мл абс. спирта и центрифугировали. Эту операцию повторяли еще три раза. Осадок растворяли в 50 мл воды и переводили в пиридиновую соль, как указано в первом опыте. Лиофилизацией получали пиридиновую соль *N*²-ацетил-2'-дезоксигуанозин-5'-фосфата с выходом 85—90%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Млхайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 1293—1316.
2. Zhdanov R. I., Zhenodarova С. М. (1975) Synthesis, 222—245.
3. Khorana H. G., Turner A. E., Vizsolyi J. P. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 686—698.
4. Reese C. B., Saffhill R. (1972) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2937—2940.

Поступила в редакцию
29.III.1977

IMPROVED METHOD FOR PREPARATION OF NUCLEOSIDE 5'-PHOSPHATES PROTECTED AT THE AMINO GROUP OF HETEROCYCLIC BASE

KOLOBUSHKINA L. I., FLORENTIEV V. L.

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

A convenient modification has been elaborated of the commonly used method for preparing *N*⁴-benzoyl-2'-deoxycytidine, *N*⁶-benzoyl-2'-deoxyadenosine, *N*²,3'-O-diacetyl- and *N*²-acetylguanosine. The method was applied to ribonucleotides. The structure of the prepared compounds was confirmed by the PMR spectra. The kinetics of solvolysis of N-protecting groups was studied both upon selective deblocking of 3'-OH group, and under conditions of the total removal of protecting groups.