



УДК 547.963.32.04

3'-О-МЕТОКСИАЦЕТИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ  
ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТОВ.  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 5'-ЦИАНЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ  
ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ

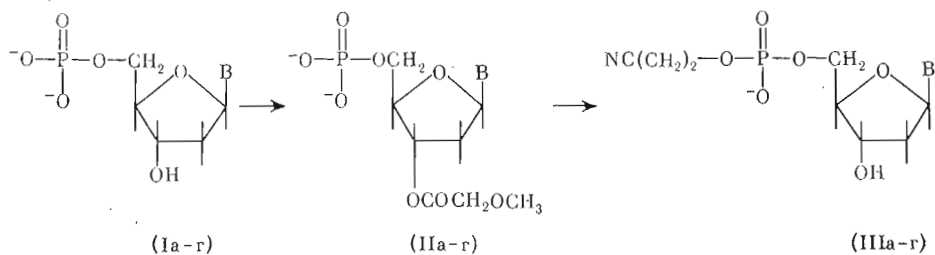
Константинов В. В., Мишарин А. Ю.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы 3'-О-метоксиацетильные производные дезокситимидин-5', N<sup>6</sup>-бензоилдезоксиаденозин-5', N<sup>4</sup>-бензоилдезоксидитидин-5' и N<sup>2</sup>-ацетилдезоксигуанозин-5'-фосфатов. Обработка полученных соединений β-цианэтанолом в присутствии арилсульфохлоридов с последующим избирательным удалением 3'-О-метоксиацетильной группы приводит к 5'-цианэтиловым эфирам соответствующих N-защищенных дезоксинуклеотидов с выходом 65–80%.

β-Цианэтильная группа широко применяется в синтезе нуклеотидов для защиты фосфатного остатка [1]. Получение цианэтиловых эфиров из N-защищенных нуклеозид-5'-фосфатов в присутствии N,N'-дихлорогексилкарбодимида [2] и арилсульфохлоридов [3] требует больших избытков β-цианэтанола. Кроме того, в последнем случае наблюдалось значительное образование 5'-бисцианэтиловых эфиров N-защищенных нуклеотидов. Использование 3'-О-ацетильных производных дезоксинуклеозид-5'-фосфатов для синтеза 5'-цианэтиловых эфиров нуклеотидов ограничено, по-видимому, получением 5'-цианэтилового эфира тимидиловой кислоты [4], поскольку в условиях аммонолиза ацетильной группы наблюдается отщепление защитных групп, блокирующих аминофункции оснований, в то время как удаление ацетильной группы щелочным гидролизом ведет к одновременному отщеплению 5'-цианэтильной группы [2]. В синтезе рибонуклеозидов из-за мягкого отщепления под действием оснований средней силы применялась метоксиацетильная группа [5–7].

Тема настоящего сообщения — синтез 3'-О-метоксиацетильных производных 2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов (II а–г) и их использование для получения цианэтиловых эфиров (III а–г) (схема).



- а: В = тимин  
б: В = N<sup>6</sup>-бензоиладенин  
в: В = N<sup>4</sup>-бензоилцитозин  
г: В = N<sup>2</sup>-ацетилгуанин

Свойства полученных соединений

Соединение	Выход, %	УФ-спектр, pH 7			R <sub>FDT</sub>		
		$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм	$\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$	А	Б	В
(IIa)	93	267	235	0,71	1,22	1,12	
(IIб)	90	280	244	1,72	1,32	1,22	
(IIв)	92	260	230	0,50	1,88	1,56	
		302	282				
(IIг)	95	256	228	0,67	1,04	1,00	
		277					
(IIIa)	80	267	235	0,70	1,32		1,74
(IIIб)	68	280	244	1,69	1,22		1,68
(IIIв)	69	260	231	0,52	1,52		2,01
		302	283				
(IIIг)	65	257	227	0,70	1,34		1,94
		277					

Метоксиацетильные производные (II а–г) получены обработкой пиридиниевых солей дезоксиинуклеотидов (I а–г) избытком метоксиуксусного ангидрида в пиридине. После разложения избытка ангидрида спиртом и гидролиза метоксиацетилфосфатов в водном пиридине соединения (II а–г) выделены в виде литиевых солей.

3'-О-Метоксиацетильные производные (II а–г) устойчивы в водных растворах при pH 7 в течение нескольких недель. Обработка их 8% раствором аммиака в метаноле в течение 12–15 мин приводит к полному отщеплению метоксиацетильной группы. Время полуреакции составляет ~2,5 мин, что согласуется с данными по лабильности эфиров метоксиуксусной кислоты [5]. Скорости отщепления используемых N-защитных групп в метанольном растворе аммиака имеют значения, меньшие по крайней мере на два порядка [8–11].

Соединения (II а–г) превращены в 5'-цианэтиловые эфиры (III а–г) реакцией с 3-кратным избытком  $\beta$ -цианэтанолом в присутствии мезитилсульфохлорида. После избыточного разложения реакционной смеси продукты выдерживали 12 мин с избытком 8% раствора аммиака в метаноле для удаления метоксиацетильной группы. Хроматографический контроль показывает, что образующийся в качестве побочного продукта 5'-бисцианэтиловый эфир (5–7%) превращается в этих условиях [12] в 5'-моноцианэтиловый эфир (III). Цианэтильная группа в соединениях (III) устойчива в спиртовых растворах аммиака. Эфиры (III) выделены при помощи хроматографии на DEAE-целлюлозе (табл. 1). Структура полученных соединений подтверждена спектрами ПМР (табл. 2). На присутствие метоксиацетильной группы в фосфатах (II а–г) указывают два синглета при 3,50–3,80 и 4,20–4,30 м.д., соответствующие протонам метоксиальной и метиленовой групп. Характерный сдвиг сигнала 3'-H в слабое поле указывает на ацилирование 3'-гидроксильной группы. (В соединениях (I а–г) и (III а–г) сигнал 3'-H скрыт сигналом  $^2\text{HOH}$ .) Наличие цианэтильной группы в соединениях (III) доказано спектрами ПМР и данными электрофоретической подвижности.

В заключение нужно отметить, что метоксиацетильные производные N-защитенных дезоксиинуклеотидов могут оказаться полезными в диэфирном методе синтеза олигонуклеотидов, поскольку возможно избирательное удаление метоксиацетильной группы в присутствии цианэтильной и N-защитных групп.

## Спектр ПМР полученных соединений

Соединение *	Химический сдвиг, δ, м.д. (J, Гц)							
	5-Н (2-Н)	6-Н (8-Н)	5-СН <sub>3</sub>	1'-Н **	2'-СН <sub>2</sub>	3'-Н	5'-СН <sub>2</sub>	Прочие сигналы ***
(IIa)	-	7,7с	1,92	6,32г	2,20-2,70м	5,51м	4,08м	СН <sub>3</sub> О- 3,86с; -СН <sub>2</sub> - 4,22с
(IIб)	8,75с	8,52с	-	6,51г	2,57-3,07м	5,56м	4,05м	СН <sub>3</sub> О- 3,50с; -СН <sub>2</sub> - 4,26с; Вz 7,20-7,95м
(IIв)	7,50д (7,9)	8,53д (7,9)	-	6,30г	2,30-2,70м	5,55м	4,01м	СН <sub>3</sub> О- 3,52с; -СН <sub>2</sub> - 4,22с; Вz 7,40-7,95м
(IIг)	-	8,30с	-	6,34г	2,45-2,95м	5,63м	4,05м	СН <sub>3</sub> О- 3,89с; -СН <sub>2</sub> - 4,27с; Nас 2,25с
(IIIa)	-	7,65с	1,89	6,27г	2,45-2,80м	Скрыт <sup>2</sup> НОН	4,12м	α-СН <sub>2</sub> и β-СН <sub>2</sub> (СN-СН <sub>2</sub> СН <sub>2</sub> -) 4,01к (6,0) и 2,84г (6,0)
(IIIб)	-	8,74 уш. с	-	6,43г	2,54-2,87м	»	4,03м	α-СН <sub>2</sub> и β-СН <sub>2</sub> (СN-СН <sub>2</sub> СН <sub>2</sub> -) 4,05к (6,0) и 2,72г (6,0); Вz 7,20-7,81м
(IIIв)	7,27д (7,8)	8,23д (7,8)	-	6,12г	2,20-2,95м	»	4,10м	α-СН <sub>2</sub> и β-СН <sub>2</sub> (СN-СН <sub>2</sub> СН <sub>2</sub> -) 4,03к (6,0) и 2,80г (6,0); Вz 7,20-7,80м
(IIIг)	-	8,14с	-	6,30г	2,45-2,95м	»	4,00м	α-СН <sub>2</sub> и β-СН <sub>2</sub> (СN-СН <sub>2</sub> СН <sub>2</sub> -) 4,01к (6,0) и 2,73г (6,0); Nас 2,26с

\* Соединения (IIa-г) — лигнаны, а (IIIa-г) — аммониевые соли.

\*\* Сигнал 1'-Н представляет собой псевдотриплет, обусловленный взаимодействием 1'-Н с диастереотопными протонами 2'-СН<sub>2</sub>-группы, J<sub>1,2'</sub> и J<sub>1,2''</sub> 6,5—6,9 Гц.

\*\*\* Отнесение совпавших сигналов проведено при помощи двойного резонанса.

## Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на приборе Spesord UV VIS (ГДР) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, в кювете с длиной оптического пути 1 см; ПМР-спектры — на приборе BS-487 С (ЧССР) в  $^2\text{H}_2\text{O}$ , концентрация образца 0,1 М, внутренний стандарт — *трет*-бутанол. Электрофорез проводили на бумаге Whatmann 1 (Англия) в 0,025 М растворе  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 7,8) при напряжении 30 В/см. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах: А — *n*-бутанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 : 2 : 3; Б — изопропанол — 1 М триэтиламмоний-бикарбонатный буфер (pH 7,5), 7 : 3; В — изопропанол —  $\text{NH}_4\text{OH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 7 : 1 : 2. Пиридин очищали по стандартной методике [13], метоксиуксусный ангидрид получали по методу [14]. Защиту аминогрупп оснований дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов (СКТВ БАВ) проводили известными методами [15, 16]. Мезитилсульфохлорид кристаллизовали из пентана. Все операции проводили при температуре не выше 30° С.

*3'-О-Метоксиацетильные производные N-защищенных дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов (II а-г)*. Пиридиновую соль нуклеотида (I а-г) в количестве 1,0 ммоль высушивали упариванием с абс. пиридином, растворяли в 5 мл абс. пиридина, добавляли 1 мл метоксиуксусного ангидрида, выдерживали смесь 4 ч при 20° С, охлаждали до 0° С, добавляли 2 мл абс. этанола, выдерживали 1 ч при 20° С. Растворитель упаривали, остаток упаривали с абс. этанолом, растирали с 15 мл абс. эфира, декантировали раствор, остаток промывали 15 мл абс. эфира, затем растворяли в 10 мл 50% водного пиридина, выдерживали 1 ч при 20° С. Раствор упаривали, упаривали еще раз с водой (5×5 мл), растворяли в воде и пропускали через колонку с 10 мл смолы дауэкс-50 ( $\text{Li}^+$ ), элюируя водой. Водный раствор упаривали, упаривали вторично с абс. этанолом (5×5 мл), затем с изопропанолом. Остаток промывали изопропанолом (4×5 мл) для удаления литиевой соли метоксиуксусной кислоты. Литиевые соли соединений (II а-г) выделяли фильтрованием или центрифугированием, промывали абс. эфиром и сушили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

*Удаление метоксиацетильной группы*. Триэтиламмониевую соль фосфатов (II а-г) в количестве 0,2 ммоль растворяли в 10 мл 8% раствора аммиака в абс. метаноле. Аликвоту по 0,1 мл отбирали через 1 мин, нейтрализовали добавлением  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и наносили на пластинку для ТСХ. Хроматографию проводили в системах А и Б. Полное превращение соединений (II а-г) в (I а-г) осуществлялось за 12–15 мин. Всю реакционную смесь быстро упаривали, затем упаривали с абс. этанолом, растворяли в воде, промывали 3 раза равным объемом хлороформа, водный слой упаривали, остаток лиофилизировали из воды. Наличие N-бевзольных групп в соединениях (I б) и (I в) проверяли по спектру поглощения и по спектру ПМР, наличие N<sup>2</sup>-ацетильной группы в фосфате (I г) — по спектру ПМР. Хроматографическая подвижность полученных в данном опыте продуктов полностью соответствовала подвижности исходных соединений (I). Во всех соединениях (II а-г) удаление метоксиацетильных защитных групп проходило с выходом, близким к количественному, без заметных побочных реакций.

*5'-Цианэтиловые эфиры N-защищенных дезоксирибонуклеотидов (III а-г)*. Пиридиновую соль соединения (II а-1) в количестве 1,0 ммоль высушивали упариванием с абс. пиридином, добавляли 3 мл 1 М раствора β-цианэтанол в абс. пиридине, 2 мл 1 М раствора мезитилсульфохлорида в абс. пиридине, смесь концентрировали до объема 3 мл и перемешивали 3,5 ч при 20° С. При охлаждении до -20° С добавляли равный объем 1 М триэтиламмоний-бикарбонатного буфера, pH 7,5, выдерживали 14 ч при 4° С, упаривали, упаривали еще раз с водой (5×5 мл), затем с абс. этанолом (5×5 мл). Добавляли 15 мл 8% раствора  $\text{NH}_3$  в абс. метаноле, выдерживали 12 мин, упаривали, снова упаривали с абс. этанолом. Остаток рас-

творяли в воде и хроматографировали на колонке (6×40 см) с целлюлозой DE-32 (Whatmann, Англия) ( $\text{HCO}_3^-$ ) в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (от 0 до 0,1 М, общий объем 9 л). Фракцию, содержащую фосфат (III а-г), упаривали, снова упаривали с водой и лиофилизировали. Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 1 и 2.

Авторы благодарны О. Л. Поляновскому за постоянное внимание к работе, Ю. А. Берлину за оказанную помощь и А. В. Курочкину за содействие в проведении спектральных (ПМР) измерений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Amarnath V., Broom A. D. (1977) Chem. Revs, 77, 183-217.
2. Weber H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 219-249.
3. Кнорре Д. Г., Левина А. С., Шубина Т. Н. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., вып. 3, с. 118-127.
4. Вознюк Л. А., Флорентьев В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 1346-1348.
5. Reese C. B., Stewart J. C. M. (1968) Tetrahedron Lett., 40, 4273-4276.
6. Van Boom J. H., Owen G. R., Preston J., Ravindranathan T., Reese C. B. (1971) J. Chem. Soc. (C), 1971, 3230-3237.
7. Van Boom J. H., Burgens P. M. J., van der Marel G., Verdegaal C. H. M., Wille G. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 1047-1063.
8. Lohrman R., Khorana H. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 4188-4194.
9. Khorana H. G., Turner A. F., Vizolyi J. P. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 686-698.
10. Ralph R. K., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 2926-2934.
11. Lapidot Y., Khorana H. G., (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3857-3862.
12. Antkowiak W. Z., Biala E., Dembek P., Kierzek R., Grześkowiak K., Kraszewski A., Wiewiorowski M. (1974) Nucleic Acids Res., Special Publication No 1. 133-136.
13. Riddick J. A., Bunger W. B. (1971) in: Organic Solvents, vol. 2, of «Techniques of Chemistry», Wiley, N. Y.
14. Eastman Codac Co., U. S. Patent No 2017187 (1932) C. A., 29, 8007 (1935).
15. Lohrman R., Soll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 819-829.
16. Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 1467-1470.

Поступила в редакцию  
25.V.1979

### 3'-O-METHOXYACETYL DERIVATIVES OF DEOXYNUCLEOSIDE 5'-PHOSPHATES; THEIR APPLICATION FOR THE SYNTHESIS OF 5'-CYANOETHYL ESTERS OF DEOXYNUCLEOTIDES

KONSTANTINOV V. V., MISHARIN A. Yu.

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

3'-O-Methoxyacetyl derivatives of deoxythymidine-5', N<sup>6</sup>-benzoyldeoxyadenosine-5'-N<sup>6</sup>-benzoyldeoxycytidine-5'- and N<sup>2</sup>-acetyldeoxyguanosine-5'-phosphates were synthesized. The treatment of the compounds obtained with β-cyanoethanol in the presence of arylsulphonylchlorides followed by selective removal of 3'-O-methoxyacetyl groups gave 5'-cyanethyl esters of the N-protected deoxynucleotides in 65-80% yield.