



УДК 577.113

ФОРМИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ МУРАВЬИНОЙ КИСЛОТОЙ

© 1997 г. В. И. Крюков[#], К. В. Антонов, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 24.02.97 г. Принята к печати 24.04.97 г.

Исследовано формилирование природных нуклеозидов с помощью муравьиной кислоты. Найдены оптимальные условия для селективного введения формильной группы в 5'-О-положение нуклеозидов.

Ключевые слова: муравьиная кислота, нуклеозиды, формильная группа, 5'-О-формилнуклеозиды.

О биологической значимости производных нуклеозидов свидетельствует значительное число работ, посвященных соединениям данного класса. Во многом внимание к этой теме обусловлено высокой антивирусной и, в частности, анти-ВИЧ-активностью, которой обладают некоторые производные природных нуклеозидов [1–3]. Одним из факторов, ограничивающих применение таких соединений в медицинской практике, является их высокая стоимость. В значительной степени это объясняется особенностями синтеза, предполагающего использование всевозможных дорогостоящих защитных групп, что допустимо в лабораторном синтезе, но нежелательно при переходе к промышленному производству. В связи с этим в нуклеотидном синтезе представляется привлекательной формильная защитная группа, обладающая помимо низкой стоимости рядом других преимуществ. Формильная защита относительно устойчива и вместе с тем легко может быть снята как в нейтральных (при кипячении в метаноле) и слабоосновных (пиридин/метанол) условиях, так и в кислых (НСl/метанол) [4, 6–9], что позволяет селективно удалять ее, не затрагивая другие наиболее распространенные ацильные защитные группы (Ac, Bz и т.п.).

Прямое формилирование муравьиной кислотой спиртовых групп хорошо известно [5]. В случае углеводов этот процесс региоселективен и позволяет избирательно ацилировать первичную спиртовую группу [4]. Нами изучена возможность такого избирательного формилирования в ряду природных нуклеозидов.

При действии муравьиной кислоты на нуклеозиды возможно одновременное протекание нескольких процессов. Основная реакция, этерификация 5'-ОН-групп с образованием целевого 5'-О-формилнуклеозида (I), сопровождается этерификацией вторичных 3'- и/или 2'- (для рибонуклеозидов) гидроксилы в исходном нуклеозиде и в про-

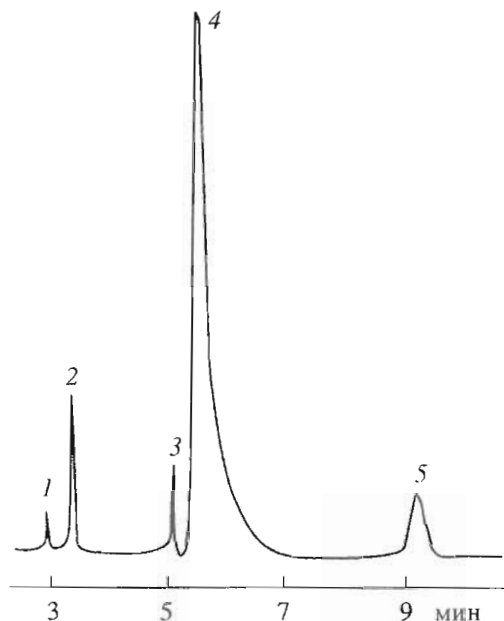
дукте (I), приводящей соответственно к 3'(2')-О-формилнуклеозидам (II) и 3'(2'),5'-ди-О-формилнуклеозидам (III). Степень селективности может быть оценена отношением концентраций соединений (I) и (II) (или (III)) в реакционной смеси. Для аденозина, гуанозина, цитидина и их дезоксирибоформ возможно (особенно при повышенной температуре) ацилирование экзоциклических аминогрупп оснований. Кроме того, для всех нуклеозидов вероятен гидролиз N-гликозидной связи с образованием рибозы (дезоксирибозы) и гетероциклического основания (IV).

Для контроля за ходом формилирования реакционные смеси, полученные после взаимодействия нуклеозидов с муравьиной кислотой в разных условиях, через определенные промежутки времени анализировали методом ВЭЖХ и определяли процентное содержание в них продуктов реакций.

На первом этапе исследований гомогенный раствор нуклеозида в 99.7% муравьиной кислоте выдерживали при 12, 25 или 60°C. Общий вид хроматограммы ВЭЖХ был примерно одинаков для реакционных смесей формилирования всех нуклеозидов (см. рисунок). Основными компонентами во всех случаях являлись производные (I)–(IV) и исходный нуклеозид. При этом ни в одном случае не были идентифицированы формамидные производные, появление которых можно было ожидать для аденозина, гуанозина и цитидина и их дезоксиформ.

Соотношение основных компонентов в ходе реакции менялось согласно общим закономерностям. В случае использования 99.7% HCOOH при 25°C время достижения максимального выхода целевых 5'-О-формилпроизводных (I) (70–76%) – “оптимальное время” – составляет 5–12 ч (таблица). Повышение температуры реакции до 60°C сокращает “оптимальное время” до нескольких часов или даже десятков минут (таблица). Однако селективность реакции при этом снижается, что вызывает падение выхода продукта (I) до ~50%, увеличение содержания диформилпроизводных (III) и появление (в случае рибонуклеозидов)

[#] Автор для переписки (тел. (095) 330-72-47 (доб. 2); 142100, г. Подольск, ул. Красная, д. 9/48, кв. 106).



ВЭЖХ реакционной смеси при формилировании аденозина. ($[Ado]_0 = 0.2 \text{ M}$, 99.7% HCOOH , 12°C , 30 ч). Условия хроматографии: колонка $0.4 \times 25 \text{ см}$, сорбент – Ultrasphere ODS, 5 мкм; элюирование со скоростью 1 мл/мин 12% водным ацетонитрилом. Пики (время удерживания, мин): 1 – Ade (2.9); 2 – Ado (3.7); 3 – 3'(2')-Form-Ado (5.1); 4 – 5'-Form-Ado (5.4); 5 – (Form) $_2$ -Ado (9.1).

2',3',5'-три-О-формилнуклеозидов (данные не приведены). На скорость гидролиза конкретного нуклеозида влияние температуры заметно ниже, чем на скорость этерификации. Однако при 60°C возможны другие, отличные от рассматриваемых выше, направления процесса, особенно в случае дезоксиаденозина и дезоксигуанозина. Это отражается в появлении множества неидентифицируемых пиков на хроматограммах ВЭЖХ (не приведены), увеличении фонового уровня оптического поглощения в УФ-спектре образцов в диапазоне 300–600 нм и потемнении реакционной массы. Снижение температуры реакции с 25 до 12°C (99.7% HCOOH замерзает при 8°C) позволяет повысить содержание 5'-О-формилпроизводного в смеси до 87–95% (это справедливо для всех исследованных нуклеозидов, кроме дезоксигуанозина). Однако при 12°C “оптимальное время” составляет 30–40 ч, что не всегда удобно.

Далее мы показали, что начальная концентрация нуклеозидов в интервале 0–1 М не оказывает существенного влияния на выход производных (I), однако при концентрациях выше 0.5 М гуанозин и цитидин растворяются не полностью (при 12 и 25°C). Отмечено также, что при концентрациях, больших 0.5 М, скорость реакции формилирования (для 99.7% кислоты) несколько уменьшается (“оптимальное время” увеличивается), видимо, из-за разбавления кислоты водой, выделяющейся

при реакции. Поэтому основные эксперименты проводились при концентрации нуклеозидов 0.2 М.

Разбавление кислоты вызывает для всех нуклеозидов ускорение процесса гидролиза (значительно увеличивается выход основания (IV)). Ожидаемого в этом ряду увеличения селективности этерификации не отмечено.

Природа нуклеозида проявляется главным образом в разной способности к гидролизу N-гликозидной связи, которая существенно выше для 2'-дезоксинуклеозидов. В случае дезоксигуанозина гидролиз настолько преобладал над реакцией этерификации, что максимальная концентрация 5'-формилнуклеозида, даже в случае использования 99.7% HCOOH , не превышала 10% при 25°C и ~1% при 12°C .

Таким образом, обработкой 0.2 М нуклеозида 99.7% муравьиной кислотой при 25 (12) $^\circ\text{C}$ можно получить целевое 5'-формилпроизводное с выходом ~75 (90)%.

После завершения реакции избыток кислоты удаляли стгонкой на роторном испарителе или лиофилизацией.

К сожалению, попытки очистить 5'-О-формилнуклеозиды перекристаллизацией не увенчались успехом. В связи с плохой растворимостью этих соединений для их перекристаллизации мы использовали полярные протонные растворители, нагревание в которых приводит к заметному деформированию, из-за чего в полученном кристаллическом продукте (I) всегда имелась примесь исходного нуклеозида. Тем не менее, увеличивая время реакции до значений, превышающих оптимальные, можно получить реакционную смесь, практически не содержащую исходного нуклеозида. Хотя при этом и образуется больше диформильных производных, они могут быть отделены в процессе кристаллизации реакционной массы при затирании в полярном апротонном растворителе (например, ацетонитриле или хлороформе с примесью этанола).

Аналитические образцы 5'-О-формилнуклеозидов получены нами полупрепаративной ВЭЖХ и охарактеризованы УФ-, ПМР- и масс-спектрами.

Таким образом, полученные результаты позволяют предложить муравьиную кислоту в качестве дешевого и удобного реагента для селективного формилирования первичных гидроксильных нуклеозидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы фирмы Sigma без дополнительной очистки и муравьиная кислота производства Ереванского завода хим. реактивов.

Индивидуальность соединений, ход реакции и выходы продуктов контролировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Waters 501 с использованием колонки ($0.4 \times 25 \text{ см}$) с сорбентом Ultrasphere

Оптимальные показатели формилирования нуклеозидов в 99,7% HCOOH и свойства полученных 5'-О-формилнуклеозидов

Исходные нуклеозиды, [Nuc] 0.2 М	Оптимальное время*, ч			Выход ^{2*} , %			5'-О-Формилнуклеозиды			
	при температуре реакции (°C)						RT ^{2*} , мин ([MeCN], %)	λ_{\max} , нм (ε)	m/z, M ⁺	$\delta_{\text{СНО}}$, м. д. ^{3*}
	12	25	60	12	25	60				
Ado	30–40	10–12	1–2	92	73	49	5.4 (12)	260 (14850)	295	8.45
dAdo	30	10–12	1–2	94	70	45	10.8 (10)	259.5 (14930)	279	8.40
Guo · 2H ₂ O	30–40	10–12	2–3	90	72	47	6.8 (6)	253 (13400)	311, 334 ^{4*} , 350 ^{5*}	8.40
dGuo	–	–	–	1	<10	–	–	–	–	–
Cyd	30–40	10–12	1–2	91	74	49	7.3 (10)	280 (12950)	271	8.45
dCyd · HCl	30	10–12	1–2	87	69	45	8.0 (15)	280 (12970)	255	8.45
dThd	15–20	5–6	1	95	75	52	6.6 (10)	267 (9490)	270, 293 ^{4*}	8.45
Urd	15–20	5–6	1	93	76	50	3.7 (10)	261 (9980)	295 ^{4*}	8.45

* Время максимального выхода 5'-О-формилнуклеозида в данных условиях. ^{2*} Данные ВЭЖХ. ^{3*} Хим. сдвиги приведены для протона 5'-СНО-группы. ^{4*} [M + Na]⁺. ^{5*} [M + K]⁺.

ODS, 5 мкм, при элюировании со скоростью 1 мл/мин в системе ацетонитрил–вода в изократическом режиме (применяемые концентрации ацетонитрила и выходы 5'-формиатов нуклеозидов приведены в таблице).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония). Точность определения молярного коэффициента поглощения ±5–7%. Съемку ¹H-ЯМР-спектров осуществляли на спектрометре Tesla BS-467 (60 МГц). Хим. сдвиги приведены в миллионных долях относительно тетраметилсилана. Масс-спектры FАВ получали на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления ядер ²⁵²Cf. Температуру плавления соединений определить не удалось, так как все полученные формилнуклеозиды подвергаются постепенному разложению даже при комнатной температуре.

Типовая методика получения 5'-О-формилнуклеозидов

К 5 мл муравьиной кислоты определенной концентрации добавляли исходный нуклеозид в количестве, необходимом для получения 0.2 М раствора. Смесь перемешивали до растворения и оставляли при требуемой температуре (12, 25 или

60°C). Ход реакции контролировали ВЭЖХ. Для прерывания реакции в требуемое время раствор упаривали на роторном испарителе (при температуре не выше 40°C). В случае пуриновых нуклеозидов полученное масло растирали с сухим ацетонитрилом, в случае пиримидиновых – с хлороформ-этанольной смесью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crumpacker C.S. // New Eng. J. Med. 1996. V. 335. P. 721–729.
2. Balzarini J. // Nucleosides Nucleotides. 1996. V. 15. P. 821–831.
3. Naesens L., Balzarini J., Declercq E. // Rev. Med. Vir. 1994. V. 4. P. 147–159.
4. Gan L.X., Whistler R.L. // Carbohydr. Res. 1990. V. 206. P. 65–69.
5. Марч Дж. Органическая химия. Т. 2. М.: Мир, 1987. С. 127.
6. Zemlicka J., Beranek J., Smrt J. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1962. V. 27. P. 2784–2790.
7. Loewenthal H.J.E. // Tetrahedron. 1959. V. 6. P. 269–303.
8. Reber F., Lardon A., Reichstein T. // Helv. Chim. Acta. 1954. V. 37. P. 45–58.
9. Reese C.B., Stewart J.C.M. // Tetrahedron Lett. 1968. P. 4273–4276.

Formylation of Nucleosides with Formic Acid

V. I. Kryukov, K. V. Antonov, and A. I. Miroshnikov

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Abstract—Formylation of natural nucleosides with formic acid was studied. The optimum conditions for selective 5'-O-formylation of nucleosides were found.

Key words: formic acid, nucleosides, formyl group, 5'-O-formyl nucleosides