



УДК 547.963.32.07 + 547.541.513

ПРИМЕНЕНИЕ АРИЛСУЛЬФОХЛОРИДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
НУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАМИДОВ

*Загребельный С. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С.,
Семенова Л. Н., Ярмолинская Е. В., Яснецкая С. М.*

*Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск;*

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

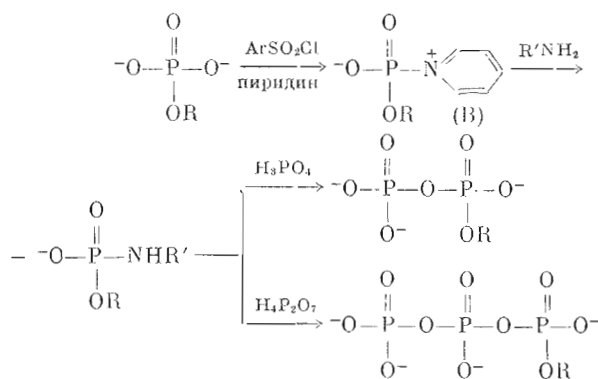
Предложен новый метод синтеза нуклеозид-5'-фосфамидов, основанный на раздельном получении активного производного нуклеотида и последующей его реакции с амином. В качестве активирующего агента использованы арилсульфохлориды, а также гранулированный полистиролсульфохлорид. Метод позволяет количественно превратить нуклеозид-5'-фосфаты в соответствующие фосфамиды. Показано, что полученные нуклеозид-5'-фосфамиды без выделения из реакционной смеси могут быть использованы для синтеза ди- и трифосфатов нуклеозидов.

Известен ряд методов получения нуклеозид-5'-фосфамидов, пригодных для синтеза ди- и трифосфатов нуклеозидов [1—7]. Наиболее приемлемый метод заключается в конденсации нуклеотидов с аминами в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Ярво выраженные аллергенные свойства последнего вызывают значительные трудности при получении больших количеств нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов. В связи с этим поиск новых методов получения амидов нуклеотидов, применимых для синтеза нуклеозид-5'-полифосфатов, является важной задачей.

Кроме дициклогексилкарбодиимида в качестве активирующих агентов для нуклеотидов часто используют арилсульфохлориды. Однако для синтеза нуклеозид-5'-фосфамидов эти соединения ранее не применялись, поскольку они способны реагировать как с нуклеотидами, так и с аминами. В работе [8] было показано, что при взаимодействии нуклеотидов с триизопропилбензолсульфохлоридом (TPS) в абсолютном пиридине образуется мономерное соединение, которому приписана структура пиридинового производного нуклеозид-5'-метафосфата (В).

Было также установлено, что это соединение является активным электрофильным агентом, быстро взаимодействующим с сильными нуклеофилами. Поскольку образование активного производного (В) и его реакция с аминами оказываются стадиями, разделенными во времени, можно использовать арилсульфохлориды для синтеза нуклеозид-5'-фосфамидов. Исследование этой возможности и было целью данной работы.

Принятые сокращения: TPS — триизопропилбензолсульфохлорид; PSS — полистиролсульфохлорид; Рур — пиперидид; М — морфолид.



R=ацетилированный нуклеозид

R'=Alk, Ar.

Для технологического использования этого метода было важно выяснить, можно ли активировать нуклеотиды *n*-толуолсульфохлоридом, более доступным по сравнению с TPS. Оказалось, что при взаимодействии дрТ (Ac) с 3 экв. TosCl в абсолютном пиридине через 45 мин количественно образуется соединение, имеющее в спектре ^{31}P -ЯМР синглет с δ 5,1 м. д., соответствующий метафосфату (B). Аналогичные результаты были получены и с ацетильными производными 5'-фосфатов уридина и цитидина.

Добавление избытка циклогексилamina, анилина, морфолина, пиперидина, имидазола к соединению (B) приводит к быстрому количественному образованию соответствующих нуклеозид-5'-фосфамидов, которые были идентифицированы по данным спектров ^{31}P -ЯМР, бумажной хроматографии и электрофореза (табл. 4).

В то время как при использовании дициклогексилкарбодиимида для получения амидов нуклеотидов выход последних существенно уменьшается с увеличением основности амина [7], применение арилсульфохлоридов позволяет количественно (90—100%) получать нуклеозид-5'-фосфамиды независимо от основности амина, что дает возможность использовать практически любые амиды нуклеотидов для синтеза нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов.

Таблица 4

Характеристика исследуемых соединений

Соединение	δ , м.д. *	R_f в системе		E_f
		A	B	
Тимидин-5'-фосфат	-3,4	0,42	0,24	1
Тимидин-5'-фосфоморфолид	-5,0	0,76	0,60	0,50
Тимидин-5'-фосфопиперидид	-5,5	0,80	0,62	0,50
Тимидин-5'-фосфоимидазолд	10,3	0,86	—	—
Тимидин-5'-фосфоциклогексиламид	-5,0	0,80	—	0,53
Тимидин-5'-фосфоанилид	1,0	0,76	—	0,50
Тимидин-5'-пиридинийметафосфат	5,1	—	—	—
Уридин-5'-фосфат	—	0,37	0,20	1
P ¹ ,P ² -диуридин-5'-пирофосфат	—	0,41	0,24	0,80
Уридин-5'-фосфоморфолид	—	0,73	0,40	0,50
Уридин-5'-фосфопиперидид	—	0,80	0,48	0,50
Цитидин-5'-фосфат	—	0,26	—	1
P ¹ ,P ² -дicitидин-5'-пирофосфат	—	0,33	—	0,81
Цитидин-5'-фосфопиперидид	—	0,72	—	0,52
Уридин-5'-дифосфат	—	0,21	—	—
Уридин-5'-трифосфат	—	0,12	0,11	—

* Спектр ^{31}P -ЯМР снят в абс. пиридине.

В работе [9] было показано, что при взаимодействии нуклеотидов с поперечносшитым полистиролсульфохлоридом (PSS) образуется активное производное нуклеотида, которое может быть отделено от полимерной матрицы фильтрованием. Добавленное к избытку амина, оно образует нуклеозид-5'-фосфамиды, свободные от примесей сульфопроизводных, что является существенным преимуществом проведения реакции в гетерогенном варианте. Другим достоинством использования PSS по сравнению с растворимыми арилсульфохлоридами является меньшая степень протекания побочных превращений. Активные производные нуклеотидов в случае полистиролсульфохлорида получали при непрерывном перемешивании нуклеотида с 15-кратным избытком PSS. На рис. 1 приведены кинетические кривые, отражающие скорость образования активных производных ацетилированных уридин-5'- и цитидин-5'-фосфатов, которые переведены в соответствующие пиперидиды. Видно, что время взаимодействия обоих нуклеотидов с PSS, необходимое для количественного образования соответствующих пиперидидов составляет 10—12 ч. Увеличение времени реакции, а также необходимого избытка сульфохлорида при использовании PSS по сравнению с TPS или TosCl объясняется гетерогенным характером реакции.

Нуклеозид-5'-фосфамиды, полученные с помощью PSS, как правило, содержат некоторое количество (до 10%) симметричных динуклеозидпирофосфатов, которые, вероятно, образуются в результате гидролиза активных производных нуклеотидов в процессе отделения от полимера.

Нуклеозид-5'-фосфамиды, полученные с помощью арилсульфохлоридов, использованы для синтеза ди- и трифосфатов нуклеозидов.

Ацетилированные уридин-5'-фосфопиперидид (Pur)pU(Ac)₂ и уридин-5'-фосфоморфолид (M)pU(Ac)₂ после удаления избытка аминов были ис-

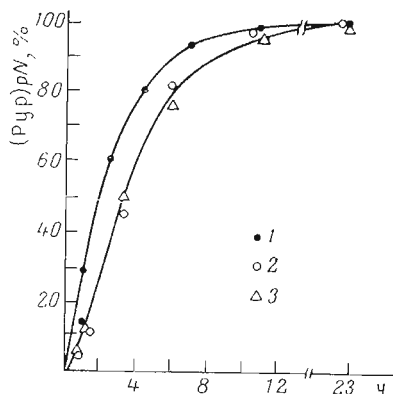


Рис. 1. Кинетические кривые образования продуктов взаимодействия нуклеотидов с 15-кратным молярным избытком PSS (в виде пиперидидов): 1, 2 — (Pur)pU(Ac)₂, 3 — (Pur)-рас³C(Ac)₂. Концентрация нуклеотидов: 1 — 0,1; 2, 3 — 0,05 М

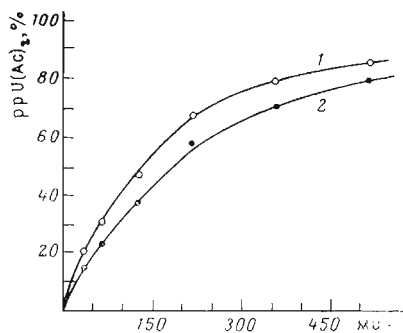


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые образования 2', 3'-ди-О-ацетилуридин-5'-дифосфата при взаимодействии (Pur)pU(Ac)₂ (1) и (M)pU(Ac)₂ (2) с ~5-кратным избытком три-*n*-бутиламмониевой соли ортофосфорной кислоты. Концентрации нуклеотидов — 0,1 М

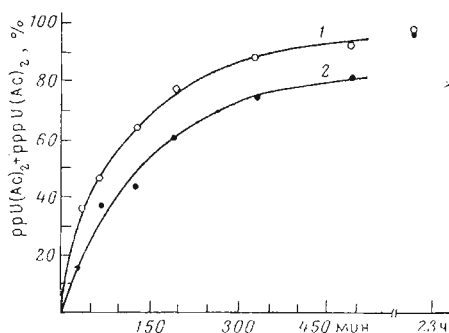


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые образования суммы 2', 3'-ди-О-ацетилуридин-5'-дифосфата и 2', 3'-ди-О-ацитидин-5'-дифосфата при взаимодействии (Pur)pU(Ac)₂ (1) и (M)pU(Ac)₂ (2) с ~2-кратным избытком бис-три-*n*-бутиламмонийной соли пироглутаровой кислоты. Количество дифосфата не превышает 10—15% по отношению к трифосфату. Концентрации нуклеотидов 0,1 М

Синтез нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов

Исходный нуклеотид	Конденсирующий агент	Промежуточный фосфамид *	Продукт реакции	Выход, %
pU(Ac) ₂	TosCl	(M)pU(Ac) ₂	ppU	75
pac ⁴ C(Ac) ₂	TosCl	(M)pac ⁴ C(Ac) ₂	ppC	81
dpT(Ac)	TosCl	d(Pyp)pT(Ac)	dpppT	72
pU(Ac) ₂	PSS	(Pyp)pU(Ac) ₂	ppU	73
pac ⁴ C(Ac) ₂	PSS	(Pyp)pac ⁴ C(Ac) ₂	ppC	72
dpT(Ac)	PSS	d(Pyp)pT(Ac)	dpppT	66

* Превращение на стадии образования фосфамидов при использовании *n*-толуолсульфохлорида — 100%, при использовании полистиролсульфохлорида — 90—100%.

пользованы в реакции с три-*n*-бутиламмониевыми солями орто- и пирофосфорной кислот. За ходом реакции следили, анализируя пробы реакционной смеси бумажной хроматографией. Из кинетических кривых (рис. 2 и 3) видно, что реакционная способность нуклеозид-5'-фосфопиперидидов несколько выше, чем соответствующих морфолидов, что отмечалось также в работе [7].

Подробно метод синтеза нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов из соответствующих фосфамидов, полученных с помощью *n*-толуолсульфохлорида, описан в работе [10] и защищен авторским свидетельством [11]; метод синтеза нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов из соответствующих пиперидидов описан в работе [12]. Выходы продуктов приведены в табл. 2.

Экспериментальная часть

В работе использовали пиридиниевые соли 2',3'-ди-О-ацетилуридин-5'-фосфата и N⁴-ацетил-2',3'-ди-О-ацетилцитидин-5'-фосфата, полученные по методике работы [13], *n*-толуолсульфохлорид (ч.), дважды перекристаллизованный из диэтилового эфира, имидазол (Reanal, Венгрия), прокаленный натрий пирофосфорнокислый (ч.), ортофосфорную кислоту (х. ч.). Полистиролсульфохлорид получали в ОХЦ НИОХ СО АН СССР по методу [12].

Абсолютные пиридин, бензол, диметилформамид готовили обычным образом. Анилин, циклогексилламин, морфолин, пиперидин, три-*n*-бутиламин перегоняли над щелочью.

Нисходящую хроматографию проводили на бумаге FN-1 и FN-2 в системах растворителей: этанол — 1 М ацетат аммония (5 : 2), pH 7 (А); изомасляная кислота — 0,5 М NH₄OH (10 : 6) (Б); электрофорез — на бумаге FN-16 при напряжении 1,5 кВ в течение 30—40 мин, используя аппарат для горизонтального электрофореза «Labor» (Венгрия). В качестве буферного раствора применяли 0,05 М бикарбонат аммония (pH 7,5). Поглощение растворов измеряли на спектрофотометре СФ-16. Спектры ³¹P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги (δ) измеряли в м. д. относительно Н₃РО₄ как внешнего стандарта с точностью до 0,1 м. д. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спинной связи ³¹P-{¹H}; диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Детали эксперимента приведены в работе [8].

*Моно-три-*n*-бутиламмониевая соль ортофосфорной кислоты.* К 20 мл 5 М раствора Н₃РО₄ добавляли 2,46 мл (10 ммоль) три-*n*-бутиламина, перемешивали и упаривали до получения стекловидного остатка, который высушивали трехкратным упариванием с абсолютным пиридином. Следы пиридина удаляли упариванием с абсолютным бензолом.

Бис-три-н-бутиламмониевая соль пиродифосфорной кислоты. На колонку с катионитом КРС-2 в пиридиниевой форме (30 мл) наносили раствор 0,7 г (2,65 ммоль) пиродифосфата натрия в 6—7 мл воды. Пиридиниевую соль пиродифосфорной кислоты элюировали 75 мл 10% водного пиридина. Элюат упаривали до ~ 7 мл. К остатку добавляли 2,4 мл (10 ммоль) три-н-бутиламина и упаривали до масла, которое высушивали упариванием с абсолютным пиридином. Следы пиридина удаляли упариванием с абсолютным бензолом.

Определение емкости полистиролсульфохлорида. Содержание сульфохлоридных групп в PSS считали равным количеству ковалентного хлора, которое определяли титрованием 0,1 М раствором AgNO_3 на потенциометре ЛПУ-01 после подкисления 25% раствором HNO_3 в метаноле. Емкость используемого образца полистиролсульфохлорида 4,7 ммоль/г. Синтезы с PSS проводили в сухой камере.

Использование п-толуолсульфохлорида для получения нуклеозид-5'-фосфамидов. Раствор 225 мкмоль ацетилированного нуклеотида и 128 мг (675 мкмоль) ToSCl в 1,5 мл абсолютного пиридина выдерживали 45 мин в тщательно закрытой колбе. Записывали спектр ^{31}P -ЯМР полученной реакционной смеси. Затем добавляли 4,5 ммоль одного из использовавшихся аминов и через ~ 5 мин еще раз записывали спектр ^{31}P -ЯМР. Раствор анализировали электрофорезом и БХ в системах А и В. Характеристики полученных фосфамидов приведены в табл. 1.

Кинетика взаимодействия нуклеотидов с полистиролсульфохлоридом. К 50 мкмоль $\text{pU}(\text{Ac})_2$ или $\text{pAc}(\text{Ac})_2$ добавляли 250 мг PSS и к смеси приливали 1 мл абсолютного пиридина. Реакцию проводили при перемешивании на магнитной мешалке. Через определенные промежутки времени из раствора отбирали аликвоты по 0,05 мл и выливали в равный объем пиперидина. Через ~ 5 мин пробы обрабатывали концентрированным аммиаком в течение 1 ч для удаления ацетильных групп и анализировали методом БХ в системе А. Пятна, соответствующие нуклеозид-5'-фосфопипериду и P^1 , P^2 -динуклеозид-5'-пиродифосфату, вырезали, элюировали водой и измеряли оптическую плотность относительно контрольной полосы (λ 261 нм для производных pU и λ 272 нм для производных pC).

Аналогично проводили реакцию 100 мкмоль $\text{pU}(\text{Ac})_2$ с 15-кратным избытком PSS в 1 мл абсолютного пиридина. Кинетические кривые исследованных реакций приведены на рис. 1.

2',3'-Ди-О-ацетилуридин-5'-фосфопиперидид $(\text{Pur})\text{pU}(\text{Ac})_2$. Активное производное нуклеотида получали при взаимодействии 280 мг $\text{pU}(\text{Ac})_2$ с 1,4 г полистиролсульфохлорида в 9 мл абс. пиридина в течение 18 ч; продукт после отделения от полимера добавляли к 1 мл пиперидина. Через ~ 5 мин избыток амина и пиридин удаляли упариванием. Полученный $(\text{Pur})\text{pU}(\text{Ac})_2$ идентифицировали по E_f и R_f в системе А после удаления ацетильных групп. В качестве примеси присутствует до 10% P^1 , P^2 -ди-ацетилуридин-5'-пиродифосфат.

2',3'-Ди-О-ацетилуридин-5'-фосфоморфолид $(\text{M})\text{pU}(\text{Ac})_2$ получали аналогично, добавляя к соответствующему активному производному 1 мл морфолина. При упаривании реакционной смеси не удается полностью освободиться от избытка морфолина.

Кинетика синтеза 2',3'-ди-О-ацетилуридин-5'-дифосфата. $(\text{Pur})\text{pU}(\text{Ac})_2$ или $(\text{M})\text{pU}(\text{Ac})_2$, полученные с помощью PSS, после удаления пиперидина и пиридина растворяли в диметилформамиде до 0,2 М растворов. К 0,5 мл каждого из этих растворов добавляли равный объем 0,96 М раствора трибутиламмониевой соли ортофосфорной кислоты в диметилформамиде. Реакцию проводили при 40°. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и после обработки концентрированным аммиаком анализировали методом БХ в системе А. Пятна, соответствующие уридин-5'-фосфамиду и ppU , вырезали, элюировали водой и измеряли оптическую плотность при λ 261 нм относительно контрольной полосы. Количественную

обработку данных проводили, принимая за 100% сумму оптических плотностей пятен уридин-5'-фосфамида и ррU в каждой полосе. Кинетические кривые приведены на рис. 2.

Кинетика синтеза 2',3'-ди-O-ацетилуридин-5'-трифосфата. К 0,5 мл 0,2 М раствора (Рур)рU(Ас)₂ или (М)рU(Ас)₂ в диметилформамиде приливали равный объем 0,42 М раствора бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в диметилформамиде. Реакцию проводили при 40°. За изменениями в реакционной смеси следили, как и в случае синтеза дифосфата, методом отбора проб и их анализа бумажной хроматографией. Количественную обработку данных проводили, принимая за 100% сумму оптических плотностей нуклеозид-5'-фосфамида и соответствующих ди- и трифосфатов в каждой полосе. Количество дифосфата не превышало 10—15% по отношению к трифосфату. Кинетические кривые приведены на рис. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kenner R. W., Todd A. R., Werb R. F. (1956) J. Chem. Soc., 1231—1237.
2. Hoard D. E., Ott D. G. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 1785—1788.
3. Cramer F., Nounoeffler H. (1962) Chem. Ber., 95, 1664—1669.
4. Michelson A. M. (1964) Biochim. and biophys. acta, 91, 1—13.
5. Van Boom J. H., Crea R., Luyten W. C., Vink A. B. (1975) Tetrahedron Lett., 2779—2782.
6. Chambers R. W., Moffat J. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 3752—3756.
7. Moffat J. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649—659.
8. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 85—96.
9. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Потапов В. К., Резвухин А. И., Туркин С. И., Шабарова З. А. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 9, вып. 4, 152—155.
10. Загребельный С. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Позднякович С. А., Ярмолинская Е. В., Вершинина С. И., Рыбак В. К. (1978) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 136—142.
11. Загребельный С. Н., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Ярмолинская Е. В. Авт. свид. № 558924 кл. С 07 Н 19/10. Бюл. изобретений и открытий № 19, 1977 г.
12. Загребельный С. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лубенец Э. Г., Позднякович С. А., Хмельницкий А. Г., Яснецкая С. М. (1978) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 142—146.
13. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6222.

Поступила в редакцию
26.VII.1977

После доработки
12.XII.1977

ARENESULPHONYL CHLORIDE USE FOR PREPARING NUCLEOSIDE 5'-PHOSPHOROAMIDATES

ZAGREBELNY S. N., ZARYTOVA V. F., LEVINA A. S.,
SEMEANOVA L. N., YARMOLINSKAYA E. V., YASNETSKAYA S. M.

*Special Technology Design Bureau for Biologically Active
Compounds, Novosibirsk; Institute of Organic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

A new method for nucleoside 5'-phosphoroamidate synthesis has been developed which relies upon preparing, as a separate stage, a nucleotide active derivative and its successive reaction with an amine. Arenesulphonyl chlorides and granulated polystyrenesulphonyl chloride were used as activating reagents. The method ensured quantitative conversion of nucleoside 5'-phosphates into corresponding phosphoroamidates. It was demonstrated that nucleoside 5'-phosphoroamidates can be used for the synthesis of nucleoside di- and triphosphates without isolation from the reaction mixture.