



УДК 547.963.32.07

## СИНТЕЗ

## 3'-О-МЕТИЛ-2'-ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ

Вознюк Л. А., Кривцын А. М., Флорентьев В. Л.

*Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР, Москва*

Разработан удобный метод метилирования диметилсульфатом в водном растворе по 3'-гидроксильной группе природных 2'-дезоксинуклеотидов. Дезаминированным рdC(Me) с помощью  $\text{NaHSO}_3$  получен аналог, содержащий урацил. Для биологических исследований синтезированы соответствующие 5'-трифосфаты.

Трифосфаты модифицированных нуклеозидов являются важными соединениями при изучении различных ферментативных реакций. В последние годы они приобретают большое значение для установления строения ДНК. В частности, специфическими ингибиторами ДНК-полимеразы являются трифосфаты 2', 3'-дидезоксинуклеозидов [1]. В этой связи было необходимо осуществить синтез трифосфатов природных 2'-дезоксинуклеозидов, содержащих метилированную 3'-оксигруппу.

Исходя из задач данного исследования, было целесообразно для получения 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов использовать природные дезоксинуклеотиды.

В химии нуклеотидов в качестве агентов, метилирующих гидроксильные группы сахарного остатка, нашли применение diazometan, метилметансульфонат, диметилсульфат и т. д. [2, 3]. Наибольшее распространение для метилирования соединений *рибо*-ряда, содержащих вицинальные гидроксильные группы, получил diazometan в присутствии двухлористого олова. Однако этот реагент нельзя использовать для решения поставленной задачи, поскольку diazometan в первую очередь реагирует с остатком фосфорной кислоты с образованием метиловых эфиров. Поэтому в качестве метилирующего агента был выбран диметилсульфат.

В связи с тем что в молекуле нуклеотида присутствует несколько нуклеофильных центров, следовало ожидать метилирования диметилсульфатом в различных направлениях. В неионизованном состоянии гидроксильная группа рибозного цикла является наиболее слабым нуклеофилом. Так, при метилировании UMP и dTMP в водном растворе диметилсульфатом при pH 6,8 образуются триметилфосфаты и N-метилированные триметилфосфаты [2]. При pH 8,2 метилированию в большей степени подвергаются гетероциклические основания, а при pH 6— фосфатная группа [3]. Применение различных катализаторов позволяет с хорошими выходами получать триметилфосфаты метилированных по нуклеиновому основанию нуклеозидов [4, 5]. Можно было ожидать, что при повышении pH по мере ионизации оксигруппы сахарного остатка ( $pK_a \sim 13$ ) реакция будет протекать преимущественно по гидроксилу сахара.

Свойства 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозид-5'-моно- и трифосфатов

Соединение	Выход, %	Элюирующая концентрация $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , М	УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$ , нм (ε)			$R_f$
			pH 1	pH 7	pH 13	
pdU (Me) *	24	0,11–0,14	262 (9400)	262 (9300)	262 (5800)	0,12
pdC (Me)	43	0,12–0,14	281 (11600)	272 (8100)	271 (7600)	0,17
pdA (Me)	67	0,16–0,18	262 (14900)	262 (13500)	262 (13500)	0,14
pdG (Me)	49	0,14–0,17	252 (12100)	252 (15100)	261 (12400)	0,14
			276 (8000)	276 (9900)	272 (12100)	
pppdU (Me)	66	0,25–0,30	261 (9900)	261 (9300)	261 (7800)	0,71
pppdC (Me)	44	0,25–0,29	280 (13400)	271 (9600)	271 (9500)	0,81
pppdA (Me)	61	0,28–0,32	261 (13700)	259 (15900)	259 (15500)	0,73
pppdG (Me)	57	0,29–0,32	252 (11800)	252 (15100)	261 (12300)	0,75
			276 (7900)	276 (9700)	272 (12000)	

\* Получен дезаминированием pdC(Me) (см. «Экспериментальную часть»).

Таблица 2

Спектры ПМР 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозид-5'-моно- и трифосфатов

Соединение	Химический сдвиг, δ, м.д. (J, Гц)				
	8-Н (6-Н)	2-Н (5-Н)	3'-ОСН <sub>3</sub>	1'-Н	2'-СН <sub>2</sub> *
pdU (Me)	7,92 д (8,0)	5,92 д (8,0)	3,37 с	6,20 т (7) **	2,32
pdC (Me)	7,96 д (7,5)	6,13 д (7,5)	3,38 с	6,16 т (7) **	2,33
pdA (Me)	8,31 с	8,01 с	3,44 с	6,26 т (7) **	2,68
pdG (Me)	8,06 с	—	3,41 с	6,14 т (7) **	2,64
pppdU (Me)	7,86 д (8,0)	5,89 д (8,0)	3,37 с	6,19 к (8; 6)	2,34
pppdC (Me)	7,84 д (7,5)	6,07 д (7,5)	3,38 с	6,19 к (8; 6)	2,34
pppdA (Me)	8,36 с	8,11 с	3,45 с	6,32 т (7) **	2,70
pppdG (Me)	7,99 с	—	3,43 с	6,14 т (7) **	2,67

\* Приведен центр мультиплета.

\*\* Полуусумма  $J_{1'2'}$  и  $J_{1'2''}$

Условия метилирования были отработаны на примере pdC. Реакцию осуществляли при значениях  $\text{pH} > 14$ , т. е. в условиях существенной ионизации ОН-группы рибозы. Чтобы регулировать избыток метилирующего агента и не позволять рН реакционной смеси опускаться ниже 14, диметилсульфат к водному раствору нуклеотида добавляли равными частями в течение 6 ч с одновременным введением эквимолекулярного количества 10 н. КОН. Пропусканием реакционного раствора через дауэкс-50 в  $\text{NH}_4^+$ -форме удаляли избыток щелочи.

Дальнейшее разделение фосфатов на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и повторная хроматография в той же системе позволяет получить 5'-фосфаты 3'-О-метилдезоксинуклеозидов с выходами 45–70% в препаративных количествах и в индивидуальном состоянии (табл. 1).

Как и ожидалось, проведение реакции при сильнощелочных значениях рН снизило образование соединений, метилированных по фосфатной группе, до 15–20%. Кроме того, при метилировании образуется до 20% соединений, метилированных по атомам азота нуклеиновых оснований, а в случае pdG — и по атому кислорода гуанина.

Спектроскопия ПМР (особенно анализ химических сдвигов  $\text{CH}_3$ -групп) является удобным методом анализа продуктов метилирования и контроля чистоты 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов (табл. 2). Сигнал 3'-О-метильной группы лежит в более слабом поле, чем сигналы метильных групп алкилированного нуклеинового основания, и для пиримидиновых нуклеотидов он располагается в области 3,3–3,4, а для пуриновых —

3,4—3,5 м.д. В соединениях, метилированных по нуклеиновому основанию, сигнал метильной группы сдвигнут в сильное поле (2,9—3,3 м.д.). Замещение по остатку фосфорной кислоты (3,5—3,7 м.д.) проявляется в дублетном расщеплении сигнала метильной группы ( $J_{\text{HP}} 12 \text{ Гц}$ ).

Как показывает анализ спектров ПМР побочных продуктов реакции, во всех случаях первоначально метилируется 3'-ОН-группа нуклеотида и лишь затем идет метилирование нуклеинового основания. Этот вывод следует из того факта, что все побочные продукты имеют сигнал 3'-О-метильной группы. Таким образом, выбранные условия реакции являются оптимальными для метилирования именно 3'-ОН-группы.

При метилировании рДТ в отработанных условиях всегда образуется соединение, метилированное одновременно по 3'-оксигруппе и по N<sup>3</sup>-атому тимина, поэтому необходимый для биологических исследований аналог, содержащий урацил, был получен дезаминированием рДС с помощью  $\text{NaHSO}_3$  по модифицированной методике [6].

Для получения 5'-трифосфатов была использована методика с применением карбопидимидозола в качестве конденсирующего агента [7]. Целевые продукты получены с выходами 60—70% (табл. 1). Их гомогенность и строение доказаны с помощью хроматографии на ионообменной бумаге DE-81, УФ-спектрами и спектрами ПМР.

### Экспериментальная часть

В работе использовали dAMP, dCMP, dGMP и dTMP (Sigma, США). Спектры ПМР снимали на приборе «Varian XL-100» (США). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР). Восходящую хроматографию на бумаге «Whatman DE-81» (Англия) осуществляли в 20% уксусной кислоте. Для колоночной хроматографии использовали DEAE-целлюлозу (Whatman, Англия).

*Метилирование дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов.* К раствору 1 ммоль динатриевой соли 2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфата в 10 мл 1 н. КОН (или 12 мл для свободной кислоты) за 6 ч при перемешивании при 20° С через каждые 30 мин прибавляли 1 мл 10 н. КОН и 0,5 мл диметилсульфата (всего 11 мл 10 н. КОН и 6 мл  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ). Реакционную массу разбавляли водой до 100 мл и пропускали через колонку с дауэксом-50 ( $\text{NH}_4^+$ -форма, 75 мл), элюировали водой, контролируя по УФ-поглощению. Элюат упаривали при 35° С до объема 150 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ -форма, 1 л). Хроматографировали  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (линейный градиент от 0 до 0,25 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , общий объем 9 л). Фракции, соответствующие монофосфату, объединяли, упаривали при 35° С досуха и многократно упаривали с водой. Метилированные дезоксирибонуклеотиды из двух опытов объединяли и повторно хроматографировали в той же системе. После упаривания и удаления  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  соединения лиофильно высушивали. Выходы и свойства синтезированных 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов приведены в табл. 1.

*3'-О-Метил-2'-дезоксигуанидин-5'-фосфат.* Раствор 1 ммоль аммониевой соли 3'-О-метил-2'-дезоксигуанидин-5'-фосфата в 10 мл 2,5 н.  $\text{NaHSO}_3$  выдерживали 16 ч при 70° С. После охлаждения рН раствора доводили до 10 и выдерживали 30 мин при 20° С. Добавлением 2 н.  $\text{HCl}$  доводили рН до 7 и выливали в 30 мл 1 М ацетата бария, предварительно нагретого до 60° С. После охлаждения до 20° С осадок центрифугировали и промывали 2××30 мл воды. Объединенные супернатанты упаривали до 100 мл и пропускали через колонку с дауэксом-50 ( $\text{H}^+$ -форма, 100 мл), колонку промывали водой, контролируя по УФ-поглощению. Элюат упаривали с водой для удаления следов уксусной кислоты, остаток растворяли в 200 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ -форма, 1 л). Хроматографию проводили как описано в общей методике метилирования дезоксирибонуклеотидов.

*5'-Трифосфаты 3'-О-метил-2'-дезоксинуклеозидов.* Раствор 1 ммоль метилированного дезоксиуклеотида в 10 мл воды наносили на колонку с дауэксом-50 (пиридиновая форма, 5 мл) и элюировали 25 мл 50% водного пиридина. К элюату добавляли 0,25 мл (1,05 ммоль) три-*n*-бутиламина, перемешивали до полного растворения, упаривали в вакууме при 35° С досуха и сушили сначала отгонкой с абс. пиридином (3×10 мл), затем с абс. диметилформамидом (2×10 мл). Остаток растворяли в 10 мл абс. диметилформамида, добавляли 0,4 г (2,5 ммоль) карбонилдиимдазола и перемешивали 5 ч при 20° С. Добавляли 0,2 мл абс. метанола и немедленно раствор 5 ммоль бис(три-*n*-бутиламмониевой) соли пиродифосфорной кислоты в 20 мл абс. диметилформамида. После перемешивания в течение 16 ч при 20° С к реакционной массе добавляли 100 мл воды и наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма, 1 л). Хроматографию проводили при 7° С, элюируя NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> (линейный градиент от 0 до 0,4 М NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub>, общий объем 10 л). Фракции, соответствующие трифосфату, объединяли, упаривали в вакууме при 30° С и многократно упаривали с водой. После рехроматографии в тех же условиях водные растворы трифосфатов лиофильно высушивали. Выходы и свойства полученных трифосфатов приведены в табл. 1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463–5467.
2. Singer B. (1975) Biochemistry, 14, 4353–4357.
3. Robins M. J., Lee A. S. K., Norris F. A. (1975) Carbohydr. Res., 41, 304–307.
4. Griffin B. E., Reese C. B. (1963) Biochim. et biophys. acta, 68, 185–192.
5. Ogilvie K. K., Beaucage S. L., Gillen M. F. (1978) Tetrahedron Lett., 3203–3206.
6. Kusmirek J. T., Giziewicz J., Shugar D. (1973) Biochemistry, 12, 194–200.
7. Колобушкина Л. И., Крицын А. М., Флорентьев В. Л. (1973) Химия гетероциклических соединений, 996–1000.

Поступила в редакцию  
20.VII.1979.

#### SYNTHESIS OF 3'-O-METHYL-2'-DEOXYNUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES

VOZNYUK L. A., KRITZYN A. M., FLORENTIEV V. L.

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

A convenient method for methylating of the 3'-hydroxy group of 2'-deoxynucleoside 5'-phosphates in aqueous solution has been developed. 2'-Deoxyuridine 5'-phosphate was prepared by deamination of pдC(Me) with NaHSO<sub>3</sub>. For biological tests the corresponding 5'-triphosphates were also synthesized.