

УДК 547.857.7

### СИНТЕЗ ТИМИДИН-5'-МОНОФОСФАТА

В. А. СВИТЦОВА, В. И. ПИЧУЖКИН, Н. Ф. МЯСОЕДОВ, З. П. АПОЛЛОНОВА

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

В работе рассматривается методика избирательного фосфорилирования тимидина в целях использования ее для синтеза меченых дезоксирибонуклеотидов. Исследуется влияние соотношения исходных компонентов, температуры, продолжительности синтеза на выход целевого продукта. Определены оптимальные условия получения тимидин-5'-монофосфата с выходом 74—76 %.

Дезоксирибонуклеотиды, меченные изотопами  $^{15}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , находят все более широкое применение при изучении метаболизма и механизма действия лекарственных препаратов, механизма действия стимуляторов

роста, в генной инженерии и других биологических и сельскохозяйственных исследованиях. Такие соединения могут быть получены только синтетическим путем. Фосфатную группу можно ввести в молекулу дезоксиинуклеозида в положение 5' сахарного кольца двумя способами: 1 — фосфорилированием различными фосфорилирующими агентами ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{POCl}_3$ ) с предварительной защитой гидроксильной группы в 3' положении сахарной части дезоксиинуклеозида и последующим деблокированием [1]; 2 — фосфорилированием свободного дезоксиинуклеозида (с помощью  $\text{POCl}_3$ , пиродифосфорилтетрахлорида) без предварительной защиты гидроксильных групп [2].

Первый способ является многостадийным процессом, который связан с большими потерями дорогостоящего меченого продукта, второй — отличается простотой исполнения, все полученные при проведении синтеза продукты, помимо целевого, могут быть использованы как полупродукты для дальнейшей переработки, в результате до минимума снижаются потери меченых соединений.

Известна методика избирательного фосфорилирования нуклеозидов с помощью фосфорилхлорида, растворенного в триалкилфосфате [3]. Приведенные в работе условия выделения продукта состоят в следующем: по окончании реакции фосфорилирования в реакционную смесь добавляют диэтиловый эфир для удаления растворителя (триалкилфосфата), продукт при этом выпадает в осадок, захватывая избыточное количество  $\text{POCl}_3$ , затем осадок растворяют в ледяной воде и pH полученного раствора доводят до 1—2. Такие условия непригодны для синтеза дезоксиинуклеотидов пуринового ряда из-за распада последних в сильноокислой среде, поэтому наша работа была посвящена усовершенствованию методики прямого фосфорилирования, позволяющей получать меченые дезоксиинуклеотиды любого строения.

Фосфорилирование проводили в термостатируемой стеклянной круглодонной колбе с магнитной мешалкой. Разделение продуктов синтеза осуществляли методом колоночной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, при этом определяли оптическую плотность на выходе из колонки.

Продукты идентифицировали с помощью ПМР, УФ и ИК-спектрального анализа соответственно на приборах Брукер-200 МГц, SPECORD-40М и UR-20 и параллельно методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» (растворитель — изопропанол : аммиак : вода=20 : 12 : 3, проявление в УФ-излучении). Количество каждого продукта определяли по оптической плотности хроматографических фракций.

Настоящая работа посвящена процессу получения тимидин-5'-монофосфата. Для его синтеза использовали тимидин производства фирмы «Реанал». Реакция фосфорилирования тимидина представлена на схеме 1.

В реакционной смеси обнаружены и идентифицированы следующие компоненты (на рис. 1 приведена элютивная кривая хроматографического разделения этой смеси): 1 — тимидин, не вступивший в ре-

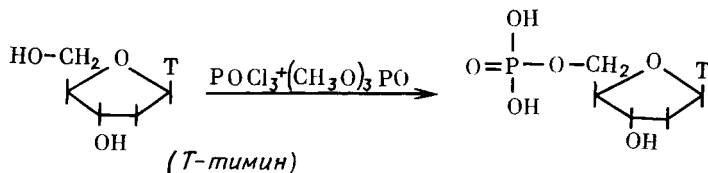


Схема 1.

акцию; 2 — промежуточный продукт, идентифицированный нами с помощью ИК- и ПМР-спектроскопии (рис. 2) как диметилэфир тимидин-5'-монофосфата, его структурная формула дана на схеме 2; 3 — тимидин-5'-монофосфат, который легко получается при кислотном

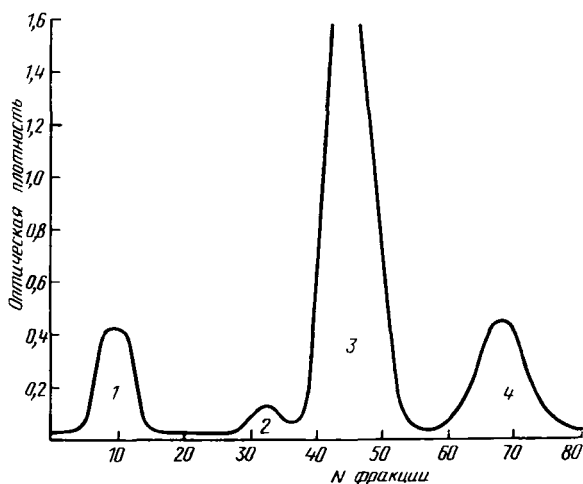


Рис. 1. Элютивная кривая хроматографического разделения продуктов синтеза тимидин-5'-монофосфата (экспликация дана в тексте).

гидролизе промежуточного продукта по схеме 3; 4 — предположительно дифосфат тимидина.

Наличие промежуточного продукта 2 позволяет предположить непосредственное участие триметилфосфата в реакции фосфорилирова-

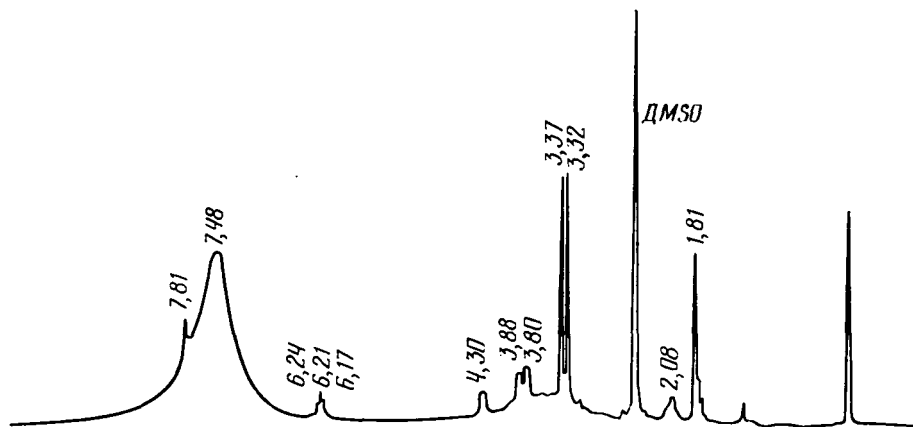
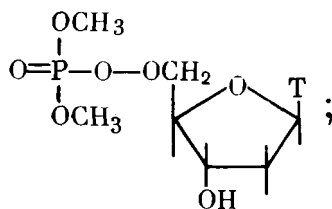


Рис. 2. ПМР-спектр промежуточного продукта (диметилового эфира тимидин-5'-монофосфата).

ния. Активным веществом, вероятно, является продукт взаимодействия (схема 4), а реакцию фосфорилирования в этом случае можно представить в виде схемы 5.



По предложенному механизму реакции фосфорилирования основными параметрами, влияющими на выход целевого продукта, являются: соотношение исходных компонентов, продолжительность выдерживания реакционной смеси и температура.

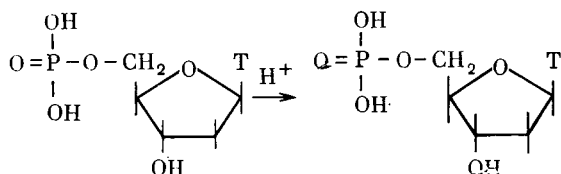


Схема 3.

В исходном соединении вместо групп OH фосфатной части следует читать OCH<sub>3</sub>.

Предварительные эксперименты показали, что для растворения 1 ммоль тимидина достаточно 2—2,5 мл (17—21 ммоль) триметилфосфата. Из схемы 4 следует, что для получения максимальной концентрации фосфорилирующего агента необходимо не менее 8,5—

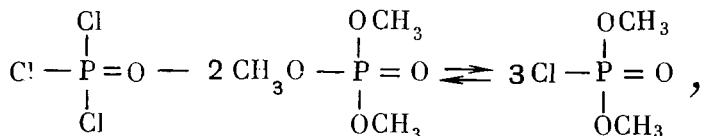


Схема 4.

10,5 ммоль POCl<sub>3</sub>. Это подтверждает зависимость между выходом продукта и молярным соотношением POCl<sub>3</sub> и триметилфосфата (рис. 3).

Оптимальную продолжительность реакции определяли, исходя из следующих соображений: визуально установлено, что порошкообраз-

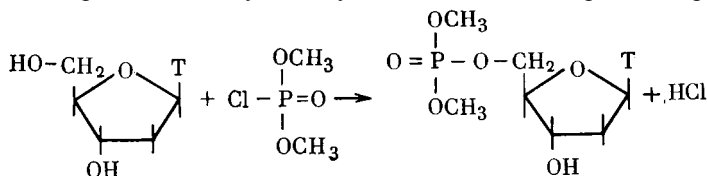


Схема 5.

ный тимидин полностью растворялся в реакционной смеси через 1,5—2 ч после начала реакции. Дальнейшее выдерживание гомогенной реакционной смеси не приводило к увеличению выхода продукта. Более того, через 10—12 ч начиналось разложение целевого продукта до полного его исчезновения в смеси. Таким образом, скорость реакции фосфорилирования лимитируется процессом растворения тимидина.

При выборе оптимальной температуры реакции следует учитывать, что в процессе повышения температуры снижается устойчивость монофосфатов, увеличивается количество продуктов 2 и 4 и уменьшается количество целевого продукта 3. В то же время понижение температуры реакции приводит к заметному ее замедлению, что контролировалось по уменьшению скорости растворения порошка тимидина. Оптимальной выбрана температура 4—6 °С.

Исходя из результатов проведенных исследований, мы предлагаем следующую методику для синтеза тимидин-5'-монофосфата. Свежеперегнанные триметилфосфат (17—21 ммоль) и фосфорилхлорид (8,5—10,5 ммоль) помещают в

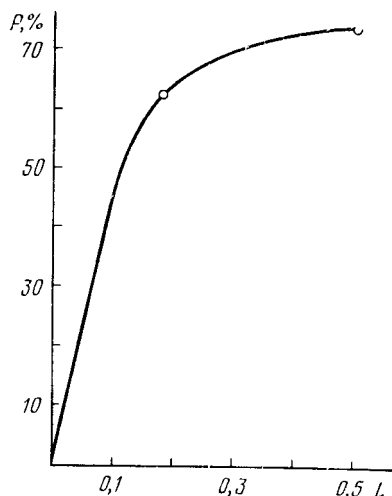


Рис. 3. Зависимость между выходом продукта (P) и молярным соотношением компонентов фосфорилирующей смеси (L).

круглодонную колбу и перемешивают в течение 15—20 мин при температуре 35—40 °С, затем смесь охлаждают до 4—6 °С и добавляют предварительно высушенный под вакуумом тимидин (1 ммоль). Смесь выдерживают при постоянной температуре, перемешивании и продувке сухим аргоном в течение 2—2,5 ч, избыточное количество  $\text{POCl}_3$  отгоняют под вакуумом при той же температуре в течение 20—30 мин и доводят значение рН смеси до 6—6,5 с помощью разбавленного раствора аммиака (4—5%). Избыток триметилфосфата удаляют экстракцией диэтиловым эфиром, реакционную смесь нагревают на водяной бане до 50—70 °С в течение 25—30 мин.

Разделение реакционной смеси рекомендуется проводить на хроматографической колонке (2×25 см), заполненной ДЕАЕ-целлюлозой в  $\text{HCO}_3^-$ -форме, раствором бикарбоната аммония, насыщенным  $\text{CO}_2$ , при градиенте концентраций 0—0,36 моль/л. Общий объем элюирующего раствора 1400 мл, скорость элюирования — 3 мл/мин. Оптическую плотность на выходе из колонки измеряют при длине волны 267 нм.

Фракции, содержащие тимидин-5'-монофосфат, объединяют и упаривают на роторном испарителе досуха. Упаривание повторяют из метилового или этилового спирта до получения постоянной массы сухого продукта, т. е. до полного разложения бикарбоната аммония.

Полученный тимидин-5'-монофосфат был идентифицирован при сравнении УФ- и ПМР-спектров со спектрами эталонного продукта (производства фирмы «Реанал»), Результаты тонкослойной хроматографии также свидетельствовали об идентичности продуктов.

Усовершенствованная методика синтеза тимидин-5'-монофосфата позволяет сократить время проведения реакции с 6 до 2—2,5 ч и повысить выход целевого продукта до 74—76 %.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фельдман И. Х., Гинесина А. А. Тимидиловая кислота —  $2\text{C}^{14}$ (5'-монофосфат тимидина) и ее бариевая соль. — В сб.: Меченые биологически активные вещества. М.: Атомиздат, 1966, вып. 2, с. 16—24. — 2. Шабаров З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1978, с. 479—481. — 3. Yoshikawa M., Kato T. — *Bull. of the Chem. Soc. of Japan*, 1969, vol. 42, p. 3505—3508.

*Статья поступила 7 января 1988 г.*

#### SUMMARY

The technique of thymidine selective<sup>^</sup> phosphorylation with the aim of using it for synthesis of labelled deoxynucleotides is discussed in the paper. The effect of correlation between initial components, temperature, duration of synthesis on the yield of final product is investigated. Optimum conditions for obtaining thymidine-5'-monophosphate with 74—76 % yield are found.