

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

148 975

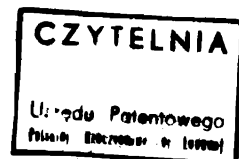
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 86 07 14 /P. 260605/

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 88 05 12

Opis patentowy opublikowano: 1990 06 30



Int. Cl.⁴ C07H 17/02

Twórcy wynalazku: Stefan Paszyc, Bohdan Skalski, Jarogniew
Bartoszewicz, Ryszard W. Adamiak, Zofia Gdaniec

Uprawniony z patentu: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Poznań; Polska Akademia
Nauk - Zakład Chemii Bioorganicznej, Poznań /Polska/

SPOSÓB WYTWARZANIA NOWYCH POCHODNYCH NUKLEOZYDOWYCH

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych pochodnych nukleozydowych o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 i R^2 oznaczają atom wodoru lub grupę acetylową, a R^3 oznacza atom wodoru, grupę acetylową, alkilową, ketalową albo łącznie z grupą R^2 stanowi funkcję ortoestrową.

Zgodnie z wynalazkiem nowe związki o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 mają wyżej podane znaczenie wytwarza się w ten sposób, że rozpuszczony w roztworach wodnych o pH 6,5 do 7,5 związek o ogólnym wzorze 2, w którym R^1 , R^2 i R^3 mają wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji fotochemicznej przez naświetlanie go w zakresie długości fal światła słonecznego. Następnie z roztworu poreakcyjnego wyodrębnia się produkt przez ekstrakcję i chromatografię, po czym ewentualnie usuwa się reszty acetylowe działaniem trójetanolaminy w bezwodnym niższym alkoholu alifatycznym.

Związki o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 mają wyżej podane znaczenie, wytworzone sposobem według wynalazku, fluoryzują barwę żółto - zieloną i stanowią barwniki laserowe. Zablokowane w pierścieniu furanozydowym neukleozydy o ogólnym wzorze 1, w którym co najmniej jeden z podstawników R^1 , R^2 i R^3 oznacza grupę acetylową, można przeprowadzić w odpowiednie nukleozydy częściowo odblokowane (R^1 albo R^2 albo $R^3 = H$) lub całkowicie odblokowane ($R^1 = R^2 = R^3 = H$) przez usunięcie grupy acetylowej za pomocą roztworu trójetanolaminy w niższym alkoholu alifatycznym.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady.

P r z y k ł a d I. Synteza nukleozydu o wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 są równe i oznaczają grupy acetylowe.

a/ Otrzymanie chlorku N-[9-/2', 3', 5'-tri-O-acetylo-β-D-ribofuranosylo/puryn-6-yl] pirydynowego /związek o wzorze 2, w którym R^1 , R^2 i R^3 są równe i oznaczają grupy acetylowe/.

Postępowano zgodnie z procedurą opisaną w pracy R.W.Adamiak, E.Biała, B.Skalski, *Nucleic Acids Res.* 13 /8/, 2589 /1985/, w myśl której suszoną nad pięciotlenkiem fosforu 2', 3', 5'-trój-O-acetyloinozynę /1 eqv/ rozpuszczono w absolutnej pirydynie /5 cm³/1 mol/ i mieszając wkroplono w temperaturze 5 do 10°C 4-chlorofenylofosforodwuchlorek /1,5 eqv/. Po 15 minutach łożnię chłodzącą usunięto i roztwór pozostawiono w ciemności przez 18 godzin. Po tym czasie roztwór poddano analizie za pomocą chromatografii cienkowarstwowej /TLC/, która wykazała całkowite przereagowanie substratu z wytworzeniem niebiesko fluoryzującego produktu. Roztwór pirydynowy zagęszczono do oleju, oziębiono do około 0°C i dodano lodu w ilości około 1g/1 mmol. Następnie mieszaninę rozcieńczono zimną wodą destylowaną /użytą w ilości 5 cm³/1 mmol/, dodano małe porcje węgla aktywnego, przesączono, a roztwór zobojętniono dodając porcjami jonit Dowex 1 w formie wodorowęglanowej /HCO₃⁻/, do uzyskania całkowitego rozkładu chlorowodoru pirydynowego. Kontrolę zakończenia reakcji przeprowadzono spektrofotometrycznie, pH roztworu wzrosło do wartości 6,5. Jonit odsączono, przemyto go wodą, a roztwór zagęszczono pod próżnią w temperaturze nie przekraczającej 35°C. Po odparowaniu pirydyny roztwór przepuszczono przez kolumnę wypełnioną jonitem Dowex 1 /Cl⁻/ użytym w ilości 4 cm³/1 mmol. Oddzielono frakcję roztworu zawierającą fluoryzujący produkt, którym jest chlorek N-[9-(2', 3', 5'-tri-O-acetylo-β-D-ribofuranosylo) puryn-6-ylo]-pirydyniowy. Produkt ten przechowywany był w postaci roztworu wodnego zagęszczonego do stężenia 0,2 mol.dm⁻³, w temperaturze 5°C, lub w postaci liofilizowanej.

b/ Otrzymywanie nukleozydu o wzorze 1, w którym R¹, R² i R³ są grupami acetylowymi. Wodny roztwór otrzymanej jak wyżej soli pirydyniowej o ogólnym wzorze 2, w którym R¹, R² i R³ są grupami acetylowymi, o stężeniu 10⁻⁴ mol.dm⁻³ potraktowano wodorowęglanem sodowym w ilości 5 ekwiwalentów, dzięki czemu uzyskano pH 7,0. Następnie roztwór soli pirydyniowej naświetlono w sposób ciągły w chłodzonym reaktorze przepływowym ze szkła Pyrex, wyposażonym w zanurzeniową lampę rtęciową emitującą światło widzialne. Reaktor pozwalał na eliminację promieniowania o długości fali mniejszej niż 290 nm /B.Skalski, R.W.Adamiak, S.Paszyc. *Nucleic Acids Symp.Ser.* 14, 293 /1984/. Szybkość przepływu roztworu w reaktorze wynosiła 4 do 8 ml/min. Naświetlanie przerywano w momencie całkowitego zaniku pasma λ = 299 nm, odpowiadającego soli pirydyniowej stanowiącej substrat reakcji fotochemicznej. Naświetlony roztwór wodny ekstrahowano dwukrotnie chloroformem, warstwy chloroformowe połączono, przemyto je wodą destylowaną, wysuszono bezwodnym siarczanem sodowym i odparowano. Stałą pozostałość oczyszczono drogą chromatografii absorbcyjnej na żelu krzemionkowym H60 firmy Merck w układzie chloroform - metanol. Frakcja zawierająca fluoryzujący związek eluowała się przy zawartości 7% metanolu w chloroformie. Eluat odparowano pod próżnią. Pozostałość rozpuszczono w małej ilości chloroformu i wkroplono do intensywnie mieszanego heksanu. Wytrącony precypitat po wysuszeniu pod próżnią stanowił chromatograficznie czysty nukleozyd o wzorze 1, w którym R¹, R² i R³ stanowią grupy acetylowe. Wydajność reakcji wyniosła 30%. Otrzymany produkt badano metodami spektrometrycznymi i spektrofotometrycznymi.

FD-MS 470/1/

UV /H₂O, pH 7/:

λ_{min} = 243 nm / ε = 10200/; 300 nm / ε = 16400/

λ_{sh} = 344 nm / ε = 3700/;

λ_{max} = 265 nm / ε = 15500/; 422 nm / ε = 9900/

Fluorescencja:

λ_{max}^{Exc} /H₂O/ = 422 nm; λ_{max}^{Em} /H₂O/ = 529 nm

wydajność kwantowa φ = 0,63 według fluoresceiny / φ = 0,92/

¹H NMR /D₂O/ ppm: 10.19 /d,1/, 9.88 /d,1/, 8.50 /t,1/, 8.33 /s,1/, 8.15 /t,1/, 7.66 /d,1/, 6.17 /dd,1/, 5.44 /m,2/, 4.36 /m,4/, 2.22 /s,3/, 2.13 /s,3/, 2.11 /s,3/.

Analiza elementarna dla C₂₁H₂₁N₅O₈

Obliczono: C 53,48; H 4,49; N 14,86%

Znaleziono: C 53,10; H 4,44; N 14,12%

P r z y k ł a d II. Synteza nukleozydu o ogólnym wzorze 1, w którym R¹, R² i R³ są równe i oznaczają grupy acetylowe. 10 dm³ roztworu soli pirydynowej o ogólnym wzorze 2, w którym R¹, R² i R³ oznaczają grupy acetylowe, otrzymanej analogicznie jak w przykładzie I

punkt a/ o stężeniu 10^{-4} mol. dm^{-3} , umieszczono w zamkniętym naczyniu szklanym ze szkła sodowego i poddano działaniu naturalnego światła słonecznego w ciągu 3 dób. Naświetlanie przerwało w momencie całkowitego zaniku pasma $\lambda_{\text{max}} = 299$ nm. Wyodrębnianie uzyskanego produktu prowadzono analogicznie jak w przykładzie I punkt b/. Produkt miał właściwości identyczne z produktem otrzymanym jak w przykładzie I w reaktorze przepływowym.

P r z y k ł a d III. Synteza nukleozydu o wzorze 1, w którym R^1 oznacza grupę acetylową, a R^2 i R^3 łącznie grupę metoksymetylidenową.

a/ Otrzymywanie wodnego roztworu chlorku N-[9-/2', 3'-O-metoksymetylideno, 5'-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl-/puryn-6-yl] pirydyniowego o wzorze 2, w którym R^1 oznacza acetylen, a R^2 i R^3 łącznie - grupę metoksymetylidenową. 5'-O-acetylo-2', 3'-metoksymetylidenozynę przeprowadzono w chlorek N[9-/2', 3'-O-metoksymetylideno-5-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl/puryn-6-yl] pirydyniowy o wzorze 2, w którym R^1 oznacza acetylen, a R^2 i R^3 łącznie grupę metoksymetylidenową, zgodnie z procedurą opisaną w przykładzie I punkt a/.

b/ Otrzymywanie nukleozydu o wzorze 1, w którym R^1 oznacza acetylen, a R^2 i R^3 łącznie grupę metoksymetylidenową. Wodny roztwór wymienionej soli pirydyniowej o stężeniu 10^{-4} mol. dm^{-3} poddano w reaktorze przepływowym naświetleniu w warunkach analogicznych jak w przykładzie I punkt b/. Tak samo również przeprowadzono wyodrębnienie produktu w postaci precypitatu. Wydajność reakcji wyniosła 30%.

Otrzymany produkt badano metodami spektrometrycznymi i spektrofotometrycznymi.

UV / H_2O /, pH 7/:

$$\lambda_{\text{min}} = 243 \text{ nm } / \epsilon = 10200/; \quad 300 \text{ nm } / \epsilon = 16400/$$

$$\lambda_{\text{sh}} = 344 \text{ nm } / \epsilon = 3700/$$

$$\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm } / \epsilon = 15500/; \quad 422 \text{ nm } / \epsilon = 9900/$$

Fluorescencja: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Exc}} / \text{H}_2\text{O} = 422 \text{ nm};$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{Em}} / \text{H}_2\text{O} = 529 \text{ nm}$$

^1H NMR / CDCl_3 / ppm: 10.20 /d,1/, 9.07 /d,1/, 8.49 /t,1/, 8.13 /t,1/, 8.35 /s,1/, 7.99 /d,1, exch. D_2O /, 6.2 /m,1/, 6.07 5.97 /2s,1/, 4.99 - 4.87 /n,2/, 4.53 /m,1/, 4.26 /m,2/, 3.44-3.35 /s,1/, 2.22 /s,3/.

Analiza elementarna dla $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7$.

Obliczono: C 53,14; H 4,45; N 16,31%

Znaleziono: C 52,90; H 4,35; N 15,98%

P r z y k ł a d IV. Synteza nukleozydu o wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 oznaczają wodór. 200 mg produktu o wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 oznaczają reszty acetylowe otrzymanego jak w przykładzie I. rozpuszczono w 70 cm^3 bezwodnego metanolu i dodano 3 dm^3 bezwodnej trójetylaminy, a następnie mieszaninę tę pozostawiono na 72 godziny w temperaturze pokojowej. W tych warunkach wypadają kryształy chromatograficznie czystego produktu o wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 są wodorem. Wydajność procesu wyniosła 45%. Otrzymany produkt badano metodami spektrometrycznymi i spektrofotometrycznymi.

UV / H_2O /, pH 7/:

$$\lambda_{\text{min}} = 243 \text{ nm } / \epsilon = 10200/; \quad 300 \text{ nm } / \epsilon = 16400/$$

$$\lambda_{\text{sh}} = 344 \text{ nm } / \epsilon = 3700/$$

$$\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm } / \epsilon = 15500/; \quad 422 \text{ nm } / \epsilon = 9900/$$

Fluorescencja: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Exc}} / \text{H}_2\text{O} = 422 \text{ nm};$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{Em}} / \text{H}_2\text{O} = 529 \text{ nm}$$

^1H NMR / $\text{DMSO}-d_6$ / ppm: 10.10 /d,1/, 8.80-8.55 /m,2/, 8.38-8.20 /t,1/ 8.24 /s,1/, 8.10 /d,1, exch, D_2O /, 5.82 /dd,1/, 5.12 /d,1/, 4.98-4.86 /m,2/, 4.24-3.87 /m,2/, 3.79 /q,1/.

Analiza elementarna dla $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$.

Obliczono: C 52,17; H 4,37; N 20,28%

Znaleziono: C 51,95; H 4,20; N 19,98%

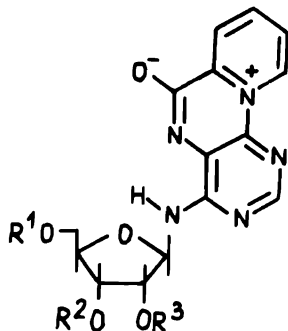
Temperatura topnienia: 200°C z rozkładem.

P r z y k ł a d V. Badanie przydatności związku o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 są resztami acetylowymi. Etanolowy roztwór związku o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 , R^2 i R^3 oznaczają grupy acetylowe o stężeniu $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^{-3}$ badano w typowym układzie do pomiarów emisji laserowej. W układzie tym źródłem wzbudzenia był impulsowy laser azotowy /typ KB 6211, firmy COBRABID produkcji polskiej/, pracujący na długości fali $\lambda = 337 \text{ nm}$. Wiązkę lasera formowano za pomocą soczewki cylindrycznej, której ognisko ustawiono na kuwecie z badanym roztworem. Wydajność kwantowa fluorescencji badanego związku była duża tak, że akcję laserową uzyskano bez dodatkowego umieszczania tego związku w zewnętrznym rezonatorze /rezonator stanowiły bezpośrednio ścianki kuwety/. Uzyskano akcję laserową w zakresie 540 do 590 nm, z możliwością selektywnego wyboru jednej z długości fal. Widmo emisji badano za pomocą spektrografu typu STE-1 firmy ŁOMO - ZSRR.

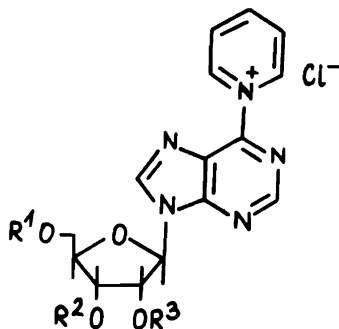
Stwierdzono także doświadczalnie, że akcję laserową można uzyskać stosując inne źródła wzbudzenia, na przykład drugą harmoniczną lasera rubinowego o długości fali $\lambda = 347,1 \text{ nm}$ lub impulsową lampę błyskową.

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Sposób wytwarzania nowych pochodnych nukleozydowych o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 i R^2 oznaczają atom wodoru lub grupę acetylową, a R^3 oznacza atom wodoru, grupę acetylową, alkiłową, ketalową, albo łącznie z grupą R^2 stanowi funkcję ortoestrową, z n a m i e n n y t y m, że rozpuszczony w wodnych roztworach o pH 6,5 do 7,5 związek o ogólnym wzorze 2, w którym R^1 , R^2 i R^3 mają wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji fotochemicznej przez naświetlenie go światłem w zakresie długości fal światła słonecznego, a następnie z roztworu poreakcyjnego wyodrębnia się produkt przez ekstrakcję i chromatografię, po czym ewentualnie usuwa się reszty acetylowe działaniem trójetyleaminy w niższym alkoholu alifatycznym.



wzór 1



wzór 2