



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ 2'-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
8-ОКСИАДЕНОЗИН-3',5'-ЦИКЛОФОСФАТА

Гуляев Н. Н., Мазурова Л. А., Северин Е. С.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра биохимии*

Осуществлен синтез ряда неизвестных ранее 2'-замещенных производных циклического аденозин-3',5'-монофосфата (сАМР). При действии азидо лития на 8,2'-апгидро-8-окси(арабино-аденозин)-3',5'-циклофосфат получен 2'-азидо-2'-дезоксидеокси-сАМР, который в результате восстановления азидной группировки каталитическим гидрированием был превращен в 2'-амино-2'-дезоксидеокси-сАМР. Ацилированием последнего *n*-нитрофениловыми эфирами уксусной, хлоруксусной и *n*-фторсульфонилбензойной кислот синтезированы соответствующие 2'-дезоксидеокси-2'-N-ацильные производные 8-окси-сАМР.

В связи с исключительно важной ролью циклического аденозин-3',5'-монофосфата (сАМР) в регуляции биологических процессов в последнее время большое внимание уделяется синтезу и изучению механизма действия различных его производных. При этом особое значение представляют аналоги сАМР, способные ковалентно присоединяться к функциональным группам ферментов.

В предыдущих работах [1—3] нами был описан синтез ряда аналогов сАМР, содержащих реакционноспособные группировки в различных положениях молекулы нуклеотида, в том числе и по 2'-ОН-группе остатка рибозы (2'-О-галоидальные производные сАМР). Однако последние исследования оказались весьма лабильными, что существенно затрудняло исследование их взаимодействия с ферментами метаболизма сАМР — протеинкиназой и фосфодиэстеразой. В то же время на основании полученных ранее результатов нами было высказано предположение о важности 2'-положения молекулы сАМР для взаимодействия с сАМР-связывающим участком протеинкиназы [1].

В продолжение этих исследований, в частности для установления природы функциональной группы протеинкиназы в области связывания 2'-ОН-группы сАМР, целесообразно было получить ряд новых аналогов циклического нуклеотида, содержащих в 2'-положении рибозного остатка активные группировки и обладающих большей устойчивостью по сравнению с ранее синтезированными 2'-О-ацильными производными сАМР [1].

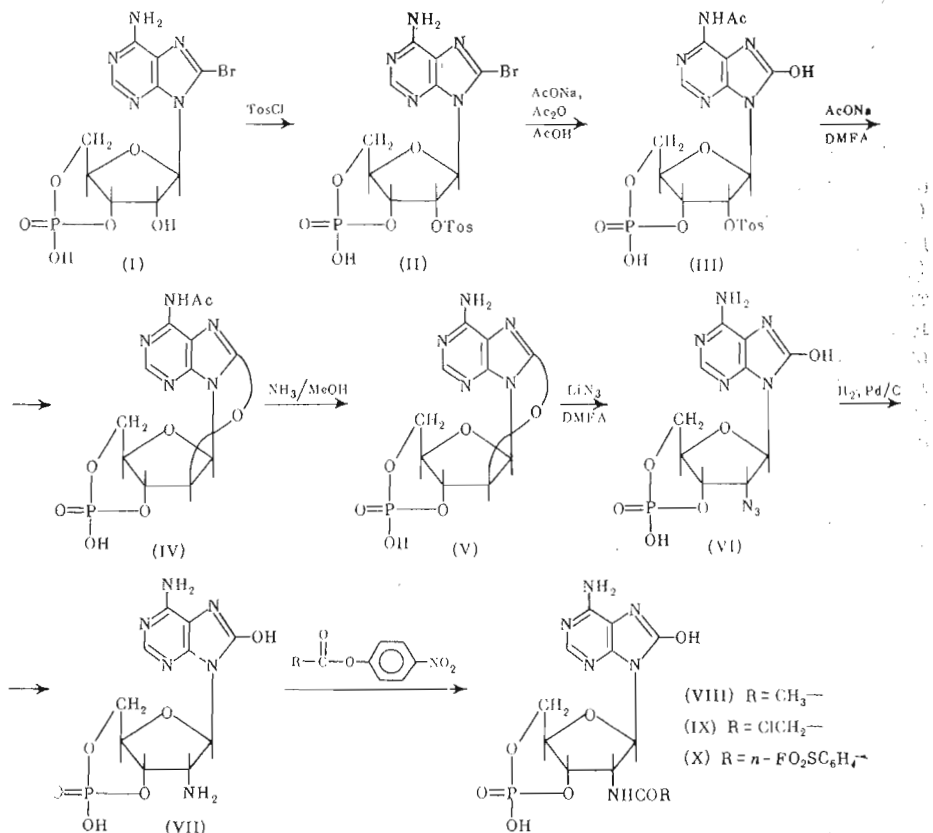
Наиболее перспективным представлялось замещение 2'-ОН-группы молекулы сАМР на фотоактивируемую азидную группировку. Последняя при облучении УФ-светом способна обеспечить ковалентное присоединение лиганда к соответствующему участку фермента [4]. С другой стороны, N₃-группировка легко превращается при восстановлении в NH₂-группу, удобную для последующих модификаций.

Настоящая работа посвящена синтезу неизвестного ранее 2'-азидо-2'-дезоксигуанозина и на его основе ряда 2'-замещенных производных циклического нуклеотида.

В литературе известно несколько способов введения азидной группировки в сахарный остаток молекулы нуклеозида: раскрытие оксирановой группировки 9-(2',3'-ангидро-β-D-дифуранозил)аденина азидом натрия [5], расщепление соответствующих ангидросвязей в 2,3'-ангидротимидине или в 8,2'-ангидроаденине под действием NaN₃ [6, 7], а также замещение 3-О-толуолсульфонильной группы в соответствующем образе защитной α-D-ксилофуранозе на N₃-группировку под действием азид лития с последующим образованием азидонуклеозида [8, 9].

Для введения азидной группировки в рибозный остаток сАМР мы использовали метод, предложенный Икехарой и сотр. для синтеза 2'-азидо-2'-дезоксигуанозина из 8,2'-О-циклоаденозина [7]. Мы подробно исследовали этот метод и показали, что он дает возможность исходить непосредственно из сАМР, поскольку позволяет осуществлять введение N₃-группировки в условиях, не затрагивающих циклофосфатную систему.

Синтез 2'-азидо-2'-дезоксигуанозина и на его основе некоторых 2'-замещенных производных 8-окси-сАМР (таблица) был осуществлен по приводимой схеме



Исходным веществом для данного синтеза являлся 8-бром-сАМР (I), полученный нами непосредственным бромированием сАМР согласно методу [10]. При введении *n*-толуолсульфонильной группировки по 2'-ОН-группе циклофосфата (I) были подобраны условия, обеспечивающие кристаллизацию 8-бром-2'-О-тозил-сАМР (II) непосредственно из реакционной смеси. Это позволило существенно упростить выделение тозилата (II) по сравнению с известным способом получения данного соединения [11].

Свойства синтезированных 3',5'-циклофосфатов 8-оксиаденозина

Соединение	Выход, %	Найдено, %				Брутто-формула
		C	H	N	P	
(VI)	26	31,00	3,90	28,72	8,01	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₆ P·H ₂ O
(VII)	73	33,05	4,10	23,10	8,65	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₆ P·H ₂ O
(VIII)	43	35,74	4,11	20,65	7,53	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₇ P·H ₂ O
(IX)	50	32,61	3,75	19,10	7,11	C ₁₂ H ₁₄ ClN ₃ O ₇ P·H ₂ O
(X)	37	37,04	3,40	15,26	5,72	C ₁₇ H ₁₆ FN ₃ O ₉ PS·H ₂ O

Соединение	Выход, %	Вычислено, %				R _f в системе A	E _{cAMP}	УФ-спектр (рН 6,0)		ИК-спектр, ν, см ⁻¹
		C	H	N	P			λ, нм	ε·10 ⁻³	
(VI)	26	30,94	3,77	28,86	7,90	0,55	1,00	268	14,0	1740 (8-C=O) 2100 (2'-N ₃)
(VII)	73	33,16	4,17	23,21	8,57	0,34	0,11	268	13,8	1740 (8-C=O)
(VIII)	43	35,65	4,24	20,80	7,66	0,40	0,95	268	13,9	1630 (C=O) 1740 (8-C=O)
(IX)	50	32,85	3,69	19,16	7,06	0,42	0,93	268	13,5	1640 (C=O) 1740 (8-C=O)
(X)	37	37,23	3,31	15,33	5,65	0,50	0,90	268 238	13,7 19,0	1200 (SO ₂ F) 1650 (C=O) 1740 (8-C=O)

Замещение атома брома в бромиде (II) на OH-группу осуществлялось обычным образом [12] и приводило к N⁶-ацетил-8-окси-2'-O-тозил-сАМР (III). При обработке тозилата (III) ацетатом натрия в диметилформамиде [12] происходила циклизация с образованием 8,2'-ангидронуклеотида (IV), последний без очистки дезацилировали действием метанольного раствора аммиака и получали 8,2'-ангидро-8-окси (*арабино*-аденозин)-3',5'-циклофосфат (V). Мы нашли, что такой порядок проведения реакций в отличие от описанных ранее условий (циклизация с предварительным либо одновременным удалением N⁶-ацетильной группы [11, 12]) дает возможность избежать образования побочных продуктов и в значительной степени повысить выход циклофосфата (V). Далее было обнаружено, что при нагревании ангидросоединения (V) в диметилформамиде в присутствии LiN₃ или NaN₃ происходит расщепление 8,2'-ангидросвязи с образованием неизвестного ранее 2'-азидо-2'-дезоксид-8-окси-сАМР (VI). При этом были найдены оптимальные температурные, временные, концентрационные параметры данной реакции и показана предпочтительность использования азидата лития по сравнению с азидом натрия. В результате восстановления N₃-группировки соединения (VI) каталитическим гидрированием над Pd/C был синтезирован не описанный ранее 2'-амино-2'-дезоксид-8-окси-сАМР (VII). Последнее соединение, содержащее свободную аминогруппу, способную подвергаться ацилированию в мягких условиях, удобно было применить в качестве исходного вещества для введения реакционно-способных группировок.

Ранее нами было показано [2, 3], что такое введение можно осуществить при помощи избирательного ацилирования алифатической NH₂-группы в составе заместителя в положениях N₍₁₎ или C₍₈₎ пуринового основания молекулы нуклеотида *n*-нитрофениловыми эфирами соответствующих кислот. Аналогичный способ был использован нами и для синтеза 2'-дезоксид-2'-N'-ацильных производных 8-окси-сАМР: при действии *n*-нитрофениловых эфиров уксусной, хлоруксусной и *n*-фторсульфоцилбензойной кислот на аминокислотид (VII) были получены соответственно неизвестные ранее 2'-N-ацетиламино-2'-дезоксид-8-окси-сАМР (VIII), 2'-дезоксид-2'-

N-хлорацетиламино-8-окси-сАМР (IX) и 2'-дезоксид-2'-*N*-(*n*-фторсульфонилбензоиламино)-8-окси-сАМР (X).

Все синтезированные аналоги сАМР были охарактеризованы элементарным анализом, подвижностью при тонкослойной хроматографии и электрофорезе на бумаге (таблица). В УФ-спектрах полученных соединений наблюдался максимум поглощения при 268 нм, а в ИК-спектрах была обнаружена полоса поглощения при 1740 см⁻¹, что характерно для 8-оксипроизводных адениновых нуклеотидов [7, 10]. В ИК-спектре соединения (VI) наблюдается интенсивная полоса поглощения при 2100 см⁻¹, характерная для азидной группировки, а в спектрах 2'-дезоксид-2'-*N*-ацильных производных сАМР присутствует полоса поглощения в области 1630—1650 см⁻¹, что соответствует валентным колебаниям карбонила амидной связи. Кроме того, в УФ-спектре соединения (X), имеющего *n*-фторсульфонилбензоильную группировку, присутствует еще один максимум поглощения при 238 нм, а в его ИК-спектре — полоса поглощения при 1200 см⁻¹, что характерно для ароматических сульфонилгалогенидов.

Следует отметить, что *N*-ацильная связь в соединениях (VIII) — (X) более устойчива по сравнению с 2'-*O*-ацильной связью в ранее полученных нами производных сАМР [1]. Так, было найдено, что при pH 7,0 и 20° С гидролиз *N*-ацильной связи в соединении (IX) происходит с периодом полупревращения, большим, чем 24 ч. В то же время дезацилирование 2'-*O*-хлорацетил-сАМР в тех же условиях протекает на 50% за 15 мин. Все это дает возможность использовать 2'-дезоксид-2'-*N*-галоидацильные производные 8-окси-сАМР, а также полученное азидное производное циклического нуклеотида для аффинной модификации сАМР-связывающих ферментов. На основании имеющихся в литературе данных [13] можно также полагать, что наличие ОН-группы в положении С₍₈₎ молекулы синтезированных аналогов сАМР не будет заметно сказываться на их способности к сАМР-связывающим центрам соответствующих ферментов.

Таким образом, синтезирован ряд неизвестных ранее производных 8-окси-сАМР, содержащих различные группировки, в том числе реакционноспособные, в 2'-положении рибозного остатка молекулы нуклеотида. Наличие группировок, активных в отношении функциональных групп фермента парядку с достаточной устойчивостью синтезированных аналогов сАМР, открывает определенные возможности для специфического ковалентного блокирования сАМР-связывающих центров соответствующих ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали сАМР (Reanal, ВНР); *n*-нитрофениловые эфиры уксусной, хлоруксусной, *n*-фторсульфонилбензойной кислот [14] были получены конденсацией нитрофенола с соответствующими кислотами в присутствии дициклогексилкарбодимидом аналогично методу [15].

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Silufol UV-254» (Chemapol, ЧССР) в системе *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 5 : 2 : 3 (А), для препаративной хроматографии использовали силикагель «Silpearl UV₂₅₄» (Kavalier, ЧССР).

Электрофорез проводили на установке высоковольтного горизонтального электрофореза ВЭФА-5-0,35 на бумаге Whatman № 1 при градиенте напряжения 50 В/см с использованием 0,1 М триэтиламмоний-бикарбонатного буфера, pH 7,5.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Hitachi 20-200» (Япония), ИК-спектры — на спектрометре IR-10 (ГДР) в виде пасты с вазелиновым маслом.

8-Бром-2'-*O*-тозил-сАМР (II). Суспендировали 1,32 г (3,2 ммоль) 8-бром-сАМР в 13 мл диоксана, содержащего 330 мг (8,2 ммоль) едкого натра и 2,62 г (13,6 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида. К полученной суспензии добавляли по каплям воду до полного растворения. Раствор остав-

ляли при 20° С на 20 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, ацетоном, эфиром и высушивали в вакууме. Выход Na-соли (II) 85%. ИК-спектр: 1180 см⁻¹ (2'-О-тозилная группа). УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}1}$ 264, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}11}$ 266 нм (ср. лит. данные [11]).

*N*⁶-Ацетил-8-окси-2'-О-тозил-сАМР (III). К раствору 1,4 г (2,44 ммоль) 8-бром-2'-О-тозил-сАМР в смеси, содержащей 25 мл ледяной уксусной кислоты и 25 мл уксусного ангидрида, добавляли 2,1 г (29,2 ммоль) ацетата натрия. Полученную смесь кипятили 3 ч. Раствор упаривали досуха, остаток несколько раз отгоняли с водой для удаления следов уксусной кислоты, затем растворяли в воде и добавляли дауэкс-50 (H⁺-форма) до рН~2. Смола отфильтровывали, раствор упаривали досуха, остаток растирали со смесью этанол — эфир (1 : 10). Осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Выход 76%. УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}1}$ 289, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}11}$ 268 и 307 нм. Ср. лит. данные [11].

8,2'-Ангидро-8-окси-*N*⁶-ацетил(арабино - аденозин) - 3',5' - циклофосфат (IV). К раствору 1,2 г (2,14 ммоль) *N*⁶-ацетил-8-окси-2'-О-тозил-сАМР в 75 мл абс. диметилформамида добавляли 2,7 г (33 ммоль) ацетата натрия и нагревали 1,5 ч при 120° С. Нерастворившийся ацетат натрия отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, продукт высаживали смесью этанол — эфир (1 : 10), осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Полученное вещество использовали без дальнейшей очистки.

8,2'-Ангидро-8-окси-(арабино-аденозин)-3',5'-циклофосфат (V). Раствор 0,6 г соединения (IV) в 5 мл. абс. метанола, насыщенного аммиаком при 0° С, оставляли при 20° С в запаянной ампуле. Через 72 ч ампулу вскрывали, раствор упаривали досуха. Остаток растворяли в воде и наносили на колонку с дауэксом-50 в H⁺-форме (1,5×20 см). Элюцию проводили водой. Фракции, обладающие поглощением при 258 нм, собирали, упаривали досуха, остаток растирали со смесью этанол — эфир (1 : 10) и высушивали в вакууме. Выход 67%. УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}1}$ 259 и 285^{пл.} нм, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH}11}$ 257 нм. Ср. лит. данные [11].

2'-Азидо-2'-дезоксидеокси-8-окси-сАМР (VI). К раствору 250 мг (0,76 ммоль) соединения (V) в 35 мл диметилформамида добавляли 250 мг (5 ммоль) азидата лития и смесь осторожно кипятили 45 мин, затем вновь добавляли 250 мг азидата лития и кипятили еще 45 мин. Нерастворившуюся часть реакционной смеси отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в воде и наносили на колонку с дауэксом-50 в H⁺-форме (1×16 см). Элюцию проводили водой. Фракции, обладающие поглощением при 268 нм, собирали, упаривали до объема 2 мл и раствор наносили на пластинку с силикагелем (2 мг/см). Препаративную тонкослойную хроматографию проводили в системе А. Полосу силикагеля с *R_f*~0,55 отделяли и продукт элюировали смесью вода — метанол — аммиак (50 : 50 : 1). Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в воде и наносили на колонку с дауэксом-50 в H⁺-форме (1×16 см). Элюцию проводили водой, фракции, обладающие поглощением при 268 нм, собирали, упаривали досуха и остаток растирали со смесью этанол — эфир (1 : 10). Выход азидата 26%.

2'-Амино-2'-дезоксидеокси-8-окси-сАМР (VII). К раствору 50 мг (0,135 ммоль) производного (VI) в смеси вода — этиловый спирт (1 : 1) добавляли 50 мг свежеприготовленного 20% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода в течение 45 мин. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в воде и наносили на колонку с дауэксом-1×8 в OH⁻ форме (1×15 см), элюцию проводили водой. Фракции, обладающие поглощением при 268 нм, собирали, упаривали досуха, остаток растирали со смесью этанол — эфир (1 : 10). Выход 73%.

2'-Дезокси-2'-*N*-ацильные производные 8-окси-сАМР (VIII) — (X). К 5 мл диметилформамида, содержащего 0,1 ммоль аминопроизводного

(VII) и 0,01 мл триэтиламина, добавляли 0,15 ммоль *n*-нитрофенилового эфира соответствующей кислоты (уксусной, хлоруксусной или *n*-фторсульфонилбензойной). Реакционную смесь перемешивали при 20° С 30 мин. Затем раствор упаривали досуха, остаток случае соединений (VIII)–(IX) растворяли в воде и наносили на колонку с дауэксом-50 в H⁺-форме (1××15 см). Элюцию проводили водой. Фракции, обладающие поглощением при 268 нм, собирали, упаривали досуха. Полученный остаток растирали со смесью этанол – эфир (1 : 10). Выход 43–50% (см. таблицу). Соединение (X) выделяли препаративной тонкослойной хроматографией в системе хлороформ – метанол (1 : 3). Полосу силикагеля с *R*_f ~ 0,50 отделяли и элюировали смесью метанол – вода (1 : 1). Элюат упаривали досуха, остаток растирали со смесью этанол – эфир (1 : 10). Осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 37%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Severin E. S., Nesterova M. V., Sashchenko L. P., Rasumova V. V., Tunitskaya V. L., Kochetkov S. N., Gulyaev N. N. Investigation of the adenosine 3',5'-cyclic phosphate binding site of pig brain histone kinase with the aid of some analogues of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. – *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 384, p. 413–422.
2. Гуляев Н. Н., Тулицкая В. Л., Нестерова М. В., Мазурова Л. А., Мургузаев И. М., Северин Е. С. Взаимодействие 8-замещенных производных и эфиров аденозин-3',5'-циклофосфата с протенинкиназой мозга свиньи. – *Биохимия*, 1977, т. 42, № 11, с. 2071–2078.
3. Гуляев Н. Н., Тулицкая В. Л., Мазурова Л. А., Северин Е. С. Синтез, физико-химические свойства и изучение кинетики перегруппировки N¹-замещенных производных аденозин-3',5'-циклофосфата. – *Биоорганич. химия*, 1979, т. 5, № 4, с. 552–562.
4. Bayley H., Knowles J. R. Photoaffinity labeling. – In: *Methods Enzymol.* (Jakoby W. B., Wilchek M., eds), New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 69–114.
5. Robins M. J., Fouron Y., Mengel R. Nucleic acid related compounds. 11. Adenosine 2',3'-ribo-epoxide. Synthesis, intramolecular degradation, and transformation into 3'-substituted xylofuranosyl nucleosides and the *lyxo*-epoxide. – *J. Org. Chem.*, 1974, v. 39, № 11, p. 1564–1570.
6. Glinski R. P., Sami Khan M., Kalamas R. L. Nucleotide synthesis. IV. Phosphorylated 3'-amino-3'-deoxythymidine and 5'-amino-5'-deoxythymidine and derivatives. – *J. Org. Chem.*, 1973, v. 38, № 25, p. 4299–4305.
7. Ikehara M., Maruyama T., Miki H., Takatsuka Y. Studies of nucleosides and nucleotides. LXXXV. Purine cyclonucleosides (35). Synthesis of purine nucleosides having 2'-azido and 2'-amino functions by cleavage of purine cyclonucleosides. – *Chem. and Pharm. Bull.*, 1977, v. 25, № 4, p. 754–760.
8. Azhayev A. V., Smrt J. Synthesis of 3'-azido-3'-deoxyadenosine and 3'-amino-3'-deoxyadenosine. – *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1978, v. 43, p. 1520–1530.
9. Azhayev A. V., Ozols A. M., Bushnev A. S., Dyatkina N. B., Kochetkova S. V., Victorova L. S., Kukhanova M. K., Kravetsky A. A., Gottikh B. P. Aminonucleosides and their derivatives. IV. Synthesis of the 3'-amino-3'-deoxynucleoside 5'-phosphates. – *Nucleic Acids Res.*, 1979, v. 6, № 2, p. 625–643.
10. Muneyama K., Bauer R. J., Shiman D. A., Robins R. K., Simon L. N. Chemical synthesis and biological activity of 8-substituted adenosine 3',5'-cyclic monophosphate derivatives. – *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 12, p. 2390–2395.
11. Khwaja T. A., Harris R., Robins R. K. Synthesis of 9-β-D-arabinofuranosyladenine-3',5'-cyclic phosphate from adenosine-3',5'-cyclic phosphate. – *Tetrahedron Letters*, 1972, № 46, p. 4681–4684.
12. Ikehara M., Kaneko M. Studies of nucleosides and nucleotides. XLII. Purine cyclonucleosides (9). Synthesis of adenine cyclonucleosides having 8,2'- and 8,3'-O-anhydro linkages. – *Chem. and Pharm. Bull.*, 1970, v. 18, № 12, p. 2401–2406.
13. Simon L. N., Shuman D. A., Robins R. K. The chemistry and biological properties of nucleotides related to nucleoside 3',5'-cyclic phosphates. – In: *Advances in cyclic nucleotide research* (Greengard P., Robison C. A., eds). N. Y.: Raven Press, 1973, v. 3, p. 225–353.
14. Steinkopf W. Über aromatische sulfodifluoride. – *J. Pract. Chem.*, 1927, B. 117, S. 1–82.
15. Rammler D. H., Khorana H. G. Studies of polynucleotides. XX. Amino acid acceptor ribonucleic acids (1). The synthesis and properties of 2'-(or 3')-O-(DL-phenylalanyl)-adenosine, 2'-(or 3')-O-(DL-phenylalanyl)-uridine and related compounds. – *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, v. 85, № 13, p. 1997–2002.

Поступила в редакцию
16.VI.1980

SYNTHESIS OF 2'-SUBSTITUTED DERIVATIVES OF 8-HYDROXYADENOSINE
3', 5'-CYCLOPHOSPHATE

GULYAEV N. N., MAZUROVA L. A., SEVERIN E. S.

Department of Biochemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A number of earlier unknown 2'-substituted derivatives of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (*cAMP*) were synthesized. When 8,2'-anhydro-8-hydroxy-9-(β -*D*-arabinofuranosyl)-adenine-3',5'-cyclophosphate was subjected to the action of lithium azide, 2'-azido-2'-deoxy-8-hydroxy-*cAMP* was obtained. The reduction of azido group in this compound by catalytic hydrogenation gave 2'-amino-2'-deoxy-8-hydroxy-*cAMP*, which was acylated with *p*-nitrophenyl esters of acetic, chloroacetic or *p*-fluorosulfonylbenzoic acids to give corresponding 2'-deoxy-2'-N-acyl derivatives of 8-hydroxy-*cAMP*.