



УДК 547.857.7'455.522'122

СИНТЕЗ АДЕНОЗИН-8-СУЛЬФОКИСЛОТЫ И РЯДА ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Завгородний С. Г., Цилевич Т. Л., Флорентьев В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Прямым замещением брома в восьмом положении аденинового цикла сульфит-анионом получены 8-сульфокислоты аденозина, 2',3'-*O*-*n*-метоксibenзилиденаденозина, аденозин-2'-, 3'- и 5'-фосфатов и аденозин-3',5'-циклофосфата. 8-Сульфоаденозин-5'-фосфат и 8-сульфоаденозин-3'-фосфат превращены соответственно в 8-сульфоаденозин-5'-трифосфат и 8-сульфоаденозин-2',3'-дифосфат. Показано, что для всех синтезированных соединений в растворе преобладает *син*-популяция.

8-Замещенные пуриновые нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в энзимологии. Особый интерес представляют соединения, несущие в восьмом положении ионогенные группы. В предыдущем сообщении [1] мы показали, что взаимодействие 8-бромаденозина и 8-бромаденозин-5'-фосфата с сульфитом натрия с удовлетворительным выходом приводит к соответствующим сульфокислотам. Настоящая работа посвящена более подробному изучению этой реакции.

Оказалось, что реакция замещения брома в восьмом положении пуринового цикла сульфит-анионом носит общий характер и может быть использована для синтеза как самого 8-сульфоаденозина, так и его фосфатов и других производных.

Основной реакцией, конкурирующей с нуклеофильным замещением, является восстановление брома. Соотношение продуктов замещения и восстановления колеблется от 2:1 до 1:2, причем преобладание реакции замещения характерно для нуклеозида и его ацетального производного по сравнению с нуклеотидом (табл. 1). Снижение выхода сульфокислот в случае аденозинфосфатов связано, вероятно, с электростатическим отталкиванием нуклеофильного агента и фосфатной группы субстрата.

Интересно, что только в случае *n*-метоксibenзилиден-8-бромаденозина кроме сульфокислоты (Iб) и продукта восстановления образуется детектируемое количество ацетального производного 8,5'-ангидро-8-оксиаденозина. Этот факт подтверждает сделанный нами ранее вывод, что ацетальная защитная группа облегчает замыкание 8,5'-ангидроцикла [2].

Синтез 8-сульфокислот аденозинфосфатов был осуществлен в две стадии. Для получения 8-бромнуклеотидов (IIIа) — (VIа) была разработана удобная модификация стандартной методики [3, 4], заключающаяся

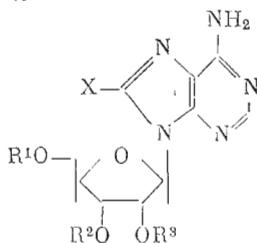
Таблица 1

Получение 8-сульфоаденозина и его производных

Соединение	Выход, %	Отношение замещения к восстановлению
2',3'- <i>O</i> - <i>n</i> -Метоксibenзилиден-3-су.п-фосфаденозин (Iб)	44	1,1
8-Сульфоаденозин (IIб)	61	1,9
8-Сульфо-5'-АМР (IIIб)	39	0,8
8-Сульфо-3'-АМР (IVб) *	13	
8-Сульфо-2'-АМР (Vб) *	21	0,6
8-Сульфо-3',5'-АМР (VIб)	29	0,5

* В реакцию вводили смесь 8-бромаденозин-2'(3')-фосфатов, полученную бромированием коммерческой смеси 2'- и 3'-аденозинфосфатов.

в использовании литий-ацетатного буфера. Избыток брома разлагали добавлением фенола и после упаривания реакционной смеси досуха и промывания остатка смесью ацетон — спирт литиевую соль бромнуклеотида выделяли с выходом 75—85%.



- (I) $R^1=H$, $R^2+R^3=CHC_6H_4OCH_3$; (II) $R^1=R^2=R^3=H$;
 (III) $R^1=PO_3H_2$, $R^2=R^3=H$; (IV) $R^1=R^3=H$, $R^2=PO_3H_2$;
 (V) $R^1=R^2=H$, $R^3=PO_3H_2$; (VI) $R^1+R^2=PO_2H$, $R^3=H$;
 (VII) $R^1=PO_3H_2$, $R^2=R^3=H$; (VIII) $R^1=H$, $R^2+R^3=PO_2H$.

Везде: а) $X=Br$; б) $X=SO_3H$.

8-Сульфокислоты (IIIб) — (VIб) получали кипячением водного раствора литиевых солей 8-бромнуклеотидов с трехкратным избытком сульфита натрия. Реакция обычно заканчивается за 4—6 ч (контроль ТСХ). Затем продукт выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе. Выходы сульфокислот и соотношение продуктов замещения и восстановления приведены в табл. 1.

Смесь 2'- и 3'-фосфатов 8-сульфоаденозина хорошо разделяется при ионообменной хроматографии, и нуклеотиды (IVб) и (Vб) были получены в индивидуальном состоянии.

Введение в восьмое положение аденинового цикла сульфогруппы резко понижает устойчивость гликозидной связи к кислотному гидролизу. При попытке получить в стандартных условиях 8-сульфо-2'-дезоксадеозин-5'-фосфат из реакционной смеси были выделены лишь 2'-дезоксадеозин-5'-фосфат и 8-сульфоаденин.

8-Сульфoadенозин-5'-трифосфат (VIIб) и 8-сульфоаденозин-2',3'-циклофосфат (VIIIб) были получены из (IIIб) и (IVб) по рутинным методам [5].

Наличие в соединениях (Iб) — (VIIIб) сульфогруппы очевидно из результатов ионообменной хроматографии. Строение всех полученных соединений подтверждено спектрами ЯМР (табл. 2). Одной из характерных особенностей спектров ¹H-ЯМР сульфопроизводных является слабый сдвиг сигнала H2' по сравнению с соответствующими незамещенными соединениями. Известно (см. обзор [6] и ссылки в нем), что смещение конформационного равновесия в сторону *син*-популяции сопровождается сдвигом сигнала H2' в слабое поле. В табл. 2 приведены величины разности химических сдвигов H2' синтезированных соединений и 5'-AMP. Последний выбран в качестве точки отсчета, поскольку в водном растворе он существует практически полностью в *анти*-популяции [7]. Заманчиво использовать эту разность для количественного описания *син-анти*-равновесия, и такие попытки делались [8, 9]. Однако дальше полуквадратных оценок дело не пошло. Осложнения возникают вследствие трудно учитываемого влияния на химический сдвиг H2' конформации рибозного цикла и 5'-оксиметильной группы. Кроме того, спектры исследуемого и «стандартного» соединений должны быть сняты в строго одинаковых условиях (концентрация, температура, растворитель), что далеко не всегда возможно. Вероятно, разумнее использовать разность химических сдвигов протонов, принадлежащих одной исследуемой молекуле. Один из таких подходов к количественному определению константы *син-анти*-равновесия, основанный на разности химических сдвигов H2' и H3', будет представлен в нашем следующем сообщении. Данные же табл. 2 позволяют уверенно утверждать, что в растворе всех синтезированных соединений преобладает *син*-популяция, причем при переходе от 8-бром- к 8-сульфосоединениям

Спектры ЯМР полученных соединений в D₂O (рН 7-7,5)

Соединение	δ, м. д.					КССВ, Гц			Δ, м.д. *	Δ', м.д. **
	H2	H1'	H2'	H3'	5'-CH ₂	1'2'	2'3'	3'4'		
8-Бром-Ado (IIa)	8,21	6,12	5,06	4,50	3,89	7,2	5,2	2,2	0,29	0,08
8-Сульфo-Ado (IIб)	8,19	6,65	5,14	4,59	3,97	6,5	5,4	2,8	0,37	0,61
2',3'-O-η-Метокси-бензилиден-8-бром-Ado (Ia)	8,24	6,27	5,59	5,11	3,59	2,6	6,2	2,2	0,82	0,23
2',3'-O-η-Метокси-бензилиден-8-сульфо-Ado (Iб)	8,25	6,92	5,63	5,23	3,92	3,4	6,8	3,2	0,86	0,88
8-Бром-5'-AMP (IIa)	8,23	6,05	5,37	4,71	4,42	6,1	5,2	3,2	0,60	0,01
8-Сульфo-5'-AMP (IIб)	8,29	6,58	5,41	4,69	4,24	5,9	5,3	3,6	0,64	0,54
8-Бром-2'-AMP (Va)	8,15	6,17	5,27	4,59	3,97	7,1	5,3	2,1	0,50	0,13
8-Сульфo-2'-AMP (Vб)	8,21	6,53	5,42	4,72	3,95	7,2	5,3	2,3	0,65	0,49
8-Бром-3'-AMP (IVa)	8,16	6,24	5,08	4,76	3,97	6,6	5,2	2,9	0,31	0,20
8-Сульфo-3'-AMP (IVб)	8,27	6,61	5,23	4,87	3,96	6,8	5,3	2,7	0,46	0,57
8-Бром-3',5'-AMP (VIa)	8,21	6,13	4,78	5,03	4,37	0,5	6,4	2,3	0,01	0,09
8-Сульфo-3',5'-AMP (VIб)	8,36	6,64	5,07	5,47	4,38	0,4	6,3	2,4	0,30	0,60
8-Сульфo-5'-ATP (VIIб)	8,35	6,59	5,42	4,17	4,36	5,7	5,4	3,5	0,65	0,55
8-Сульфo-2',3'-AMP (VIIIб)	8,28	6,72	5,59	5,17	3,96	3,6	6,8	4,4	0,82	0,68

* Разность химических сдвигов H2' полученного соединения и 5'-AMP.

** Разность химических сдвигов H1' полученного соединения и 5'-AMP.

Таблица 3

УФ- и КД-спектры 8-сульфоаденозина и его фосфатов при рН 7

Соединение	УФ-спектр	КД-спектр	
	λ _{max} , нм (ε)	B _{1u} , нм (Δε)	B _{2u} , нм (Δε)
8-Сульфo-Ado (IIб)	266 (15300)	256 (+1,46)	276 (-2,11)
8-Сульфo-5'-AMP (IIб)	267 (14600)	259 (+0,77)	277 (-1,31)
8-Сульфo-3'-AMP (IVб)	267 (14400)	257 (+0,69)	277 (-1,42)
8-Сульфo-2'-AMP (Vб)	267 (14200)	256 (+0,61)	276,5 (-1,38)
8-Сульфo-3',5'-AMP (VIб)	266 (15100)	259 (+0,46)	278,5 (-1,78)
8-Сульфo-5'-ATP (VIIб)	267,5 (14700)	260 (+0,32)	276,5 (-1,50)
8-Сульфo-2',3'-AMP (VIIIб)	266 (13900)	259 (+0,52)	277 (-1,10)

доля *син*-популяции возрастает. Поскольку конформация 8-сульфоаденозин-5'-фосфата и трифосфата определяется мощным и дальнедействующим электростатическим отталкиванием отрицательно заряженных фосфатной и сульфогрупп, разумно предположить, что эти соединения существуют полностью в *син*-конформации.

Теперь становится понятным слабополюный сдвиг сигнала H1' в спектрах ЯМР сульфосоединений (Iб)–(VIIIб) (табл. 2). В *син*-конформации отрицательно заряженная сульфогруппа сближена с H1', что сопровождается дезэкранированием протона, подобно тому как отрицательно заряженная фосфатная группа дезэкранирует H8 в *анти*-конформации пуриновых 5'-нуклеотидов [6].

Спектры КД (табл. 3) подтверждают сделанные выше выводы относительно конформационной ситуации в растворе 8-сульфопроизводных аденозина и его фосфатов. Положительный дихроизм в полосе B_{1u} свидетельствует о преобладании *син*-популяции [10].

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР сняты на приборе XL-100 (Varian, США), УФ-спектры — на спектрофотометре Beckman 25 (США), спектры КД — на дихрографе Mark-III (Jobin Yvon, Франция). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, СССР) в системе изопропанол — NH₄OH — H₂O (7:2:1). Для аналитической ионообменной хроматографии использовали DEAE-бумагу DE-81 (Whatman, Англия). Хроматограммы проявляли 0,05 М HCl (в открытой камере). Препаративную ионообменную хроматографию проводили на колонке объемом 1 л с DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия). Элюировали раствором бикарбоната аммония (линейный градиент концентрации).

2',3'-О-п-Метоксибензилиден-8-сульфокислота (Iб). Смесь 3,51 г (7,5 ммоль) *2',3'-О-п-метоксибензилиден-8-бромаденозина (Ia)* [2] и 1,51 г (12,0 ммоль) Na₂SO₃ в 150 мл 50%-ного водного этанола кипятили 10 ч, охлаждали, разбавляли 100 мл воды и экстрагировали хлороформом. Экстракты упаривали досуха и получали 1,47 г твердого остатка. Раствор 100 мг этого остатка в минимальном количестве хлороформа наносили на колонку (10×2 см) с силикагелем L40/100 (Kavalier, СССР) и элюировали 5% этанолом в хлороформе. После упаривания соответствующих фракций получали 19 мг (0,28 г в пересчете на все количество остатка) *2',3'-О-п-метоксибензилиден-8,5'-ангидро-8-оксиаденозина* и 79 мг (1,19 г в пересчете на все количество остатка) *2',3'-О-п-метоксибензилиденаденозина*. Оба соединения идентичны полученным ранее [2]. Водный слой после экстракции хлороформом упаривали до небольшого объема и оставляли на ночь на холоду. Осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅ и получали 1,67 г Na-соли сульфокислоты (Iб). Вещество разлагается при T > 235°С. Найдено: С 42,50, Н 3,81, N 13,95. C₁₈H₁₈N₅NaO₈·H₂O. Вычислено: С 42,77, Н 33,99, N 13,86.

Таким образом, выходы продуктов замещения, восстановления и циклизации равны соответственно 44, 41 и 10%.

Аденозин-8-сульфокислота (IIб). Смесь 1,384 г (4 ммоль) 8-бромаденозина и 0,808 г (6,4 ммоль) Na₂SO₃ в 40 мл 50% водного этанола кипятили 8 ч, охлаждали и наносили на колонку (4×2,5 см) с дауэксом-50 (H⁺). Продукт элюировали водой, фракцию обрабатывали избытком конц. NH₄OH, упаривали и аммониевую соль сульфокислоты перекристаллизовывали из воды, выход 0,886 г (61%). Вещество разлагается при T > 200°С. Найдено: С 32,87, Н 4,51, N 22,98. C₁₀H₁₆N₆O₇S. Вычислено: С 32,97, Н 4,43, N 23,07.

Продолжение элюции 2,5% NH₄OH привело после упаривания фракции и перекристаллизации продукта из воды к получению аденозина, идентичного по всем характеристикам коммерческому препарату, выход 0,342 г (32%).

Бромирование аденилнуклеотидов. К раствору 1 ммоль Na-соли цуклеотида в 30 мл 0,5 М Li-ацетатного буфера, рН 4 (в случае свободной кислоты — в 33 мл буфера) добавляли 0,16 мл (0,48 г, 3 ммоль) брома. Смесь при эпизодическом помешивании оставляли на 3 ч при 20°С. К полученному раствору добавляли 0,28 г фенола в 3 мл воды, смесь упаривали досуха и остаток промывали смесью абс. ацетон — абс. этанол (1:1). Получали литиевые соли 8-бромнуклеотидов (IIIa) — (VIa) с выходом 75–85%.

Получение 8-сульфокислот аденилнуклеотидов. Водный раствор 1 ммоль 8-бромнуклеотида (IIIa) — (VIa) и 0,38 г (3 ммоль) Na₂SO₃ кипятили 4–6 ч (контроль ТСХ) до исчезновения исходного соединения. После охлаждения раствор разбавляли 100 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (Whatman, Англия). Элюировали раствором NH₄HCO₃ (линейный градиент). Продукты восстановления элюируются при концентрации NH₄HCO₃ 0,2–0,25 М, а сульфопроизводные — при 0,3–0,35 М. Фракции, содержащие продукт, упаривали, несколько раз переупаривали с водой и лиофилизировали. 8-Сульфокислоты (IIIб) — (VIб) получали в виде аммониевых солей. Выходы и соотношение продуктов замещения и восстановления приведены в табл. 2.

8-Сульфoadенозин-5'-трифосфат (VIIб). К суспензии сухой бис-три-*n*-бутиламмониевой соли 8-сульфoadенозин-5'-фосфата, полученной из 233 мг (0,5 ммоль) аммониевой соли, в 2,5 мл абс. DMF добавляли 405 мг (2,5 ммоль) *N,N'*-карбонилдиимидазола и смесь перемешивали на магнитной мешалке 3 ч при 20° С. Добавляли 0,1 мл абс. метанола и сразу раствор 2,5 ммоль бис-три-*n*-бутиламмониевой соли пиродифосфорной кислоты (получена из 1,12 г $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Смесь перемешивали 16 ч на магнитной мешалке при 20° С, упаривали досуха, растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Хроматографировали как в предыдущем опыте. Элюирующая концентрация $\text{NH}_4\text{HCO}_3 \sim 0,45$ М. Выход аммониевой соли (VIIб) 71%.

8-Сульфoadенозин-2',3'-циклофосфат (VIIIб). К суспензии 0,5 ммоль сухой бис-три-*n*-бутиламмониевой соли 8-сульфoadенозин-3'-фосфата, полученной из 233 мг аммониевой соли (IVб), в 10 мл абс. метанола добавляли 1 г *N,N'*-дициклогексилкарбодимид и смесь перемешивали 16 ч при 20° С. Упаривали досуха, размешивали с 100 мл воды, фильтровали и фильтрат наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Элюирующая концентрация $\text{NH}_4\text{HCO}_3 \sim 0,26$ М. Выход аммониевой соли (VIIIб) 93%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Завгородний С. Г., Готтих Б. П., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1982, т. 9, № 10, с. 1421–1423.
2. Завгородний С. Г., Дяткина Н. Б., Гнучев Н. В., Готтих Б. П., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 5, с. 681–695.
3. Ikehara M., Uesugi S. Chem. Pharm. Bull., 1969, v. 17, № 2, p. 348–354.
4. Ikehara M., Tazawa I., Fukui T. Chem. Pharm. Bull., 1969, v. 17, № 5, p. 1019–1024.
5. Колобушкина Л. И., Крицын А. М., Флорентьев В. Л. Химия гетероцикл. соед., 1973, № 7, с. 996–1000.
6. Davies D. B. Progress in NMR Spectroscopy, 1978, v. 12, № 1, p. 135–225.
7. Бобрускин И. Д., Курничников М. П., Покровская М. Ю., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1163–1181.
8. Dudycz L., Stolarski R., Pless R., Shugar D. Z. Naturforsch., 1979, v. 34c, № 2, p. 359–373.
9. Stolarski R., Dudycz L., Shugar D. Eur. J. Biochem., 1980, v. 108, № 1, p. 111–121.
10. Флорентьев В. Л. В кн.: Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Изд. ВИНТИ, 1976, т. 8, ч. 1, с. 162–229.

Поступила в редакцию
9.I.1984
После доработки
6.IV.1984

SYNTHESIS OF ADENOSINE 8-SULFONIC ACID AND SOME OF ITS DERIVATIVES

ZAVGORODNY S. G., TSILEVICH T. L., FLORENTIEV V. L.

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

8-Sulfonic acids of adenosine, 2',3'-*o*-*p*-methoxybenzylidene adenosine, adenosine 2'-, 3'- and 5'-phosphates and adenosine 3',5'-cyclophosphate were prepared by direct substitution of bromine in eighth position of adenine ring by sulfite anion. 8-Sulfoadenosine 5'-phosphate and 8-sulfoadenosine 3'-phosphate were converted into 8-sulfoadenosine 5'-triphosphate and 8-sulfoadenosine 2',3'-cyclophosphate, respectively. The *syn*-population was shown to predominate in solution for all the prepared compounds.