

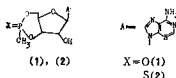
研究简报

腺嘌呤核苷 3',5'-环甲基磷酸与硫代环甲基磷酸的合成

王春光 戴远鹏 张礼和

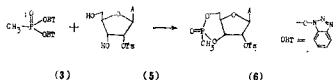
(北京医科大学药学院, 北京 100083)

腺嘌呤核苷 3',5'-环磷酸 (cAMP) 在细胞增殖和分化过程中起重要作用, 其磷酸部分的修饰物可能作为 cAMP 在体内的模拟物、拮抗物或贮存形式而发挥作用⁽¹⁾, 还有的表现出抗癌作用⁽²⁾。为进一步研究 cAMP 的磷酸部分修饰与生物活性间的关系, 研究 cAMP 中磷原子的立体化学对生物活性可能的影响, 我们设计了腺嘌呤核苷 3',5'-环甲基磷酸类化合物, 这里报道一个简便合成法。

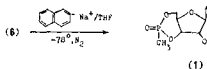


关于 cAMP 环磷酸部分修饰的报道不多⁽³⁾, Bajwa 和 Bentrude 报道, 从胸腺嘧啶核苷制得 3',5'-环亚磷酸二甲胺, 再经甲醇解及碘甲烷作用生成胸苷 3',5'-环甲基磷酸⁽⁴⁾; 但此法第一步生成环亚磷酸酯的产率很低 (10%), 无法大量制备供药理实验用。Van Boom 等在用双功能基试剂 O, O'-双 (1-苯并三唑基) 甲基膦酸酯 (3) 合成多核苷酸中曾观察到有少量副产物尿苷 3',5'-环甲基磷酸生成⁽⁵⁾。除此外尚未见到有 3',5'-环甲基磷酸腺苷类物质的报道。我们应用试剂 3 与 4 于环核苷酸合成中, 取得成功。

方便得到的 2'-O-对甲苯磺酰基腺苷 5 (3 mmol) 与 3 (0.16 mol/L, 4 mmol) 在 20°C 无水条件下反应 1 h, 再加 N-甲基咪唑 (15 mmol) 继续搅拌 24 h, 经过后处理, 硅胶柱层析, 得到产率为 47% 的 6;



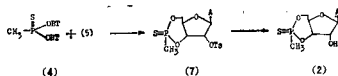
6 以蒽化钠/四氢呋喃溶液 (0.85 mol/L) 在 -78°C、无水条件下处理⁽⁶⁾, 脱去对甲苯磺酰基, 即得目的化合物 1, 产率 79.8%:



本文于 1988 年 9 月 19 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

用磷酸化试剂 4 与原料 5 按相仿步骤反应,不需甲基咪唑即可环合,得产率 46% 的 7, 再脱 Ts 基得目的化合物 2, 产率 80%;



1 与 2 均为新化合物。

我们曾发现核苷的环磷酸化反应是立体选择性的,在一定条件下只得某一种异构体⁽⁷⁾。在本文报告的反应条件下,也只获得一种产物。然而,在试验脱 Ts 基的条件时,最初以蔡钠/乙二醇二甲醚溶液处理 6,发现不仅有 1 生成,而且还有另一产物 6b 生成,¹H NMR 指示带有 Ts 基。经 MS, ³¹P 和 ¹H NMR 数据的分析,确定这一新的产物与前述环合产物(6a 即 6)为一对 P 原子构型不同的立体异构体。后来改用蔡钠/THF 溶液处理 6 则未观察到此现象而只得脱 Ts 产物 1。因此推测为乙二醇二甲醚中有微量醇与金属钠反应造成碱性异构化。后以有机胺处理 6 也得类似结果。这个现象是我们第一次发现,现正进一步研究中。

据文献^(4b), P 原子上的甲基处于直立键时,³¹P NMR 的化学位移在高场,而平伏键的异构体应有较低场化学位移。故从 5 直接环化得到的产物 6 其结构为 6a, 6 经碱处理后得到的新化合物结构为 6b (6a, 6b 的光谱数据见表 1):



Tab 1. The spectral data for the isomers 6a and 6b

	6a	6b
FAB-MS	482(M ⁺ +1)	482(M ⁺ +1)
¹ H NMR (DMSO-d ₆) δ ppm	1.64 (d, J=18 Hz, 3H, CH ₃ P) 2.43 (s, 3H, CH ₃ Ph) 6.14 (s, 1H, 1'-H) 6.0 (s, NH ₂ , disappeared after D ₂ O exchange) 7.3 (d, 2H, aromatic) 7.7 (d, 2H, aromatic)	1.62 (d, J=18 Hz, 3H, CH ₃ P) 2.34 (s, 3H, CH ₃ Ph) 5.90 (s, 1H, 1'-H) 6.04 (s, NH ₂ , disappeared after D ₂ O exchange) 6.9 (d, 2H, aromatic) 7.7 (d, 2H, aromatic)
³¹ P NMR (DMSO-d ₆) δ ppm	30.49	32.04

因用蔡钠/THF 脱 Ts 基不影响磷原子的构型,故推断 1 中甲基也处于直立键位置。2 的生成与 1 应有相同历程,故推测 2 中甲基亦取直立键。因通过碱处理后得 6a, 6b 量甚少,未做脱 Ts 反应。有关立体化学问题正在进一步研究中。

用小鼠肝癌腹水细胞, 分别加入 1 或 2, 测 ^3H -TdR 参入细胞的 DNA 合成, 1 在浓度为 10 mg/ml 时给出抑制率为 47%; 2 不显抑制作用。

实 验 部 分

吡啶用氯化钙回流 16 h 蒸出, 再用对甲苯磺酰氯 (50g/L) 回流 6 h, 然后蒸出。二氧六环用金属钠回流 16 h 后蒸出, DMF 用氯化钙回流 12 h 蒸出。上述溶剂皆加分子筛 (4Å) 保存。甲基磺酰二氯 (Aldrich) 和甲基硫代磺酰二氯 (戴敦华教授赠送) 用前蒸馏, 1-羟基苯并三唑 (Aldrich) 在真空中 (P_2O_5) 50°C 干燥 72 h。TLC 采用 Merck F_{254} 硅胶板, 展开系统(A) $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3(1:9)$, (B) $\text{THF}-\text{CHCl}_3(3:2)$ 。硅胶柱层析用山东即墨产硅胶 (230~400 目)。 ^1H , ^{31}P NMR 由 JEOL-FX 90Q 测出, 分别以 TMS, 85% H_3PO_4 为内标, FAB-MS 由 IAB-HS 质谱仪测出。UV 由 DU-7 型紫外仪测出。元素分析由 P-E 2400 型元素分析仪测出。测熔点用温度计读数未经校正。化合物 5 按文献 8 改进制备。

0,0-双(1-苯并三唑基)甲基磺酸酯 (3) 和 0,0-双(1-苯并三唑基)甲基硫代磺酸酯 (4)

将甲基磺酰二氯 (0.36 ml, 3.8 mmol) 或甲基硫代磺酰二氯 (0.558 g, 3.8 mmol) 溶于无水二氧六环 (5 ml) 中, 滴加入含 1-羟基苯并三唑 (1.025 g, 7.6 mmol) 的无水吡啶 (0.75 ml, 9 mmol) 和无水二氧六环 (17 ml) 中, 室温搅拌 6 h, 然后在无水条件下过滤, 得 0.16 mol/L 的 3 或 4 的贮备液。 ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 44.96, (3)。

2'-O-对甲苯磺酰基腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基磺酸 (6)

以无水 DMF (10 ml) 溶解干燥的 5 (1.26 g, 3.0 mmol), 再加入 3 (20.5 ml, 4.1 mmol), 室温下密封搅拌。2 h 后加入 N-甲基咪唑 (1.2 ml, 15 mmol), 继续搅拌 24 h。加入碳酸氢三乙胺缓冲液 (pH 7) (约 1 ml) 搅拌 10 min, 再以 CHCl_3 (100 ml) 稀释, 依次用上述缓冲液 (30 ml) 和水 (30 ml $\times 2$) 洗涤。有机层以无水 Na_2SO_4 干燥过滤。浓缩至 1.5 ml, 以硅胶柱 (1.5 $\times$ 16 cm, 16 g) 层析, 甲醇-氯仿 (0~5% CH_3OH) 洗脱, 得白色粉末 0.59 g (47%)。mp $177\sim 179^\circ\text{C}$, Rf (A) 0.38, (B) 0.18。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 252,

309。FAB-MS m/z 482 ($\text{M}^+ + 1$), ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ_{ppm} 1.64 (d, 3 H, $\text{J} = 18 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{-P}$), 2.43 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$), 6.14 (s, 1 H, $1'\text{-H}$), 5.92 (s, 2 H, NH_2 , D_2O 交换后消失), 7.50 (q, 4 H, C_6H_4), 7.60, 8.22 (s, s 各 1 H, 杂环); ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ_{ppm} 30.49。

2'-O-对甲苯磺酰基腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基硫代磺酸 (7)

以无水 DMF (5 ml) 溶解干燥的 5 (0.63 g, 1.5 mmol) 将此溶液滴入新制备的溶液 4 (11 ml, 2.0 mmol) 中, 室温下搅拌 12 h。加入碳酸氢三乙胺缓冲液 (1 ml) 搅拌 10 min, 真空下蒸干得糖浆, 加入 CHCl_3 (50 ml) 得白色固体 0.345 g (46%)。mp $228\sim 231^\circ\text{C}$ (分解)。Rf (A) 0.37, (B) 0.41。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 257.5。FAB-MS m/z 498 ($\text{M}^+ + 1$), ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ_{ppm} 2.04 (d, $\text{J} = 16.8 \text{ Hz}$, 3 H, $\text{CH}_3\text{-P}$), 2.35 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$), 6.08 (s, 1 H, $1'\text{-H}$), 7.36 (s, 2 H, NH_2 , D_2O 交换后消失), 7.50 (q, 4 H, C_6H_4), 8.03 (s, 1 H, 杂环); ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ_{ppm} 102.17。

腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基磺酸 (1) 与腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基硫代磺酸 (2)

经升华纯化的 1.2 g 溶于无水 THF (10 ml) 中, 在氮气流保护下迅速加入新切割的

金属钠片 (0.2 g), 外用冰水浴, 搅拌 2 h, 得墨绿色稠状溶液备用。

化合物 6 或 7 (100 mg) 以无水 THF 溶解 (约 10 ml), 在无水与氮气保护下, 外用 -78°C 冰浴, 用注射器慢慢加入上述制得之苯化钠/THF 溶液 (0.85 mol/L) 不停地搅拌。当 TLC 指示原料点消失时, 即停加脱保护试剂, 加入少量 10% 冰乙酸/THF 溶液中和以达 pH 6~7, 除去冰浴使反应混合物缓缓升至室温。苯化钠/THF 用量约 2 ml。蒸干溶液, 残渣加 CHCl_3 , 过滤, 滤液浓缩至 1 ml 左右以旋转薄层 (1 mm 厚硅胶板) 分离, 洗脱液为 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ (0~5% CH_3OH), 得 1 或 2 分别为 79.8% 和 80%。

1: mp 219~220°C, Rf (A) 0.14, (B) 0.05. $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}^{\text{MeOH}}$ nm 258.5. FAB-MS m/z 328 (M^++1). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.61 (d, 3 H, $J=17.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-P}$), 5.87 (s, 1 H, 1'-H), 6.20 (s, 1 H, OH), 7.30 (s, 2 H, NH_2). 此二峰可被 D_2O 交换。8.06 (s, 1 H, 8-H), 8.10 (s, 1 H, 2-H); ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 30.56. 元素分析 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3\text{P}$, 计算值 % C 40.37, H 4.31, N 21.40; 实测值 % C 40.40, H 4.41, N 21.13.

2: mp 216~217°C (分解), Rf (A) 0.29, (B) 0.28. $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}^{\text{MeOH}}$ nm 258.5. FAB-MS m/z 344 (M^++1). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 2.05 (d, 3 H, $J=16.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-P}$), 5.96 (s, 1 H, 1'-H), 6.24 (d, 1 H, OH) 和 7.30 (s, 2 H, NH_2) D_2O 可交换。8.12 (s, 1 H, 8-H), 8.31 (s, 1 H, 2-H). 元素分析 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4\text{PS}$, 计算值 % C 38.49, H 4.11, N 20.40; 实测值 % C 38.79, H 4.35, N 20.02.

环合产物 (6) 的 P 原子构型转变

6 (100 mg) 以苯化钠/乙二醇二甲醚溶液 (0.85 mol/L, 约 4 ml) 处理, 分离得三个产物: 6a Rf (A) 0.36, (B) 0.17, 38 mg; 6b Rf (A) 0.35, (B) 0.15, 25 mg; 1 Rf (A) 0.14, 10 mg. 光谱数据见表 1. 取 10 mg 6 经 n -丁胺处理 (室温, 3 h) 也得上述结果。

感谢 解放军防化学院戴教授赠送试剂; 北医大仪器中心王主动代测 NMR 谱。

关键词 腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基磷酸; 腺嘌呤核苷 3', 5'-环甲基硫代磷酸, 立体异构体; 抗癌作用

参 考 文 献

1. Miller JP. Cyclic nucleotide analogues, in: Cramer H and Schultz J, ed. *Cyclic 3', 5'-Nucleotide Mechanisms of Action*. New York: John Wiley & Sons 1977: 77.
2. 张礼和, 等. 环状核苷酸的磷酸酯、磷酸盐的合成及生物活性的研究. 科学通报 1984; 13: 820.
3. (a) Benitude WG and Tomasz J. Simple method for the preparation of the individual diastereoisomers of ribonucleoside 3', 5'-cyclic N, N-dimethylphosphoramidates. *Synthesis* 1984; (1):27.
(b) Beres J, et al. A highly efficient one-flask method for the preparation of the individual diastereoisomers of ribonucleoside 3', 5'-cyclic N-substituted phosphoramidates via the direct Appel reaction. X-ray structure of trans-5-isopropyl-2'-deoxyuridine 3', 5'-cyclic N-benzyl-phosphoramidates. *J Org Chem* 1985; 50:1271.
4. (a) Bajwa GS and Benitude WG. Thymidine nucleoside 3', 5'-cyclic phosphoramidates and phosphoramidites and phosphites. Configuration at phosphorus in trivalent and pentavalent cyclic nucleotides by ^{31}P and ^{13}C NMR. *Tetrahedron Lett* 1978; (5):421.
(b) Bajwa GS and Benitude WG. Preparation of diastereoisomeric thymidine 3', 5'-cyclic methylphosphonates. Assignment of Rp and Sp configuration by ^{13}C NMR. *Ibid* 1980; 21:4683.
5. (a) Van der Marel, et al. A new approach to the synthesis of phosphotriester intermediates of nucleotides.

- eosides and nucleic acids. *Ibid* 1981; 22:3887.
- (b) Marugg JE, et al. Synthesis of nucleic acids methylphosphonates via the 1-hydroxybenzotriazole phosphotriester approach. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:2171.
6. Closson WD and Wried P. Reductive cleavage of toluenesulfonates with sodium naphthalene. *J Am Chem Soc* 1966; 88:1581.
7. 徐成, 张礼和. 核苷环磷酰化反应中的立体化学. 高等学校化学学报 1989, 10:549.
8. Ikahara M and Uesugi S. Studies of nucleosides and nucleotides. LIII. Reductive cyclonucleosides—
18. Selective tosylation of adenine nucleotides. *Tetrahedron* 1972; 28: 3687.

A FACILE SYNTHESIS OF ADENOSINE 3', 5'-CYCLIC METHYLPHOSPHONATE AND METHYLPHOSPHONOTHIOATE

CG Wang, YP Dai and LH Zhang

(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT A facile synthesis of adenosine 3', 5'-cyclic methylphosphonate (1) and 3', 5'-cyclic methylphosphonothioate (2) was accomplished by treatment of 2'-protected adenosine with O,O-bis (1-benzotriazolyl) methylphosphonate or O,O-bis (1-benzotriazolyl) methylphosphonothioate under mild conditions, respectively. The ability of the compounds to inhibit DNA synthesis in mice hepatoma was tested. A pair of diastereomers of 2'-protected (1) was separated and the configuration at the phosphorus atom was identified.

Key words Adenosine 3', 5'-cyclic methylphosphonate; Adenosine 3', 5'-cyclic methylphosphonothioate; Diastereomer; Antineoplastic.