

鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸衍生物的合成及生物活性研究

蔡海英 张礼和

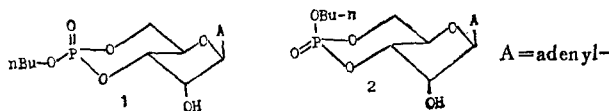
(北京医科大学药学院, 北京 100083)

摘要 本文报道用三价磷试剂与保护的鸟嘌呤核苷反应, 经碘氧化生成鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酰胺, 并对它们的生物活性做了初步研究, N²-二甲胺基甲基烯基-2'-叔丁基二甲硅基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酰胺对小鼠肝癌腹水细胞的 DNA 和 RNA 合成有一定的抑制作用。N²-二甲胺基甲基烯基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸丁酯的两个磷原子构型不同的异构体可激活腺苷酸环化酶, 使大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的 cAMP 水平增高。

关键词 鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酰胺; 腺苷酸环化酶

腺嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸 (以下简称 cAMP) 和鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸 (以下简称 cGMP) 被认为是激素效应的信使。在许多生命过程中, 它们通过各自的作用进行生物调节。因它们是内源性物质, 合成其类似物有可能发现高效、低毒、有特异性作用的药物⁽¹⁾。对它们的研究也将丰富人们对其作用机理的认识, 促进从分子水平了解更多重要的生理、生化过程。

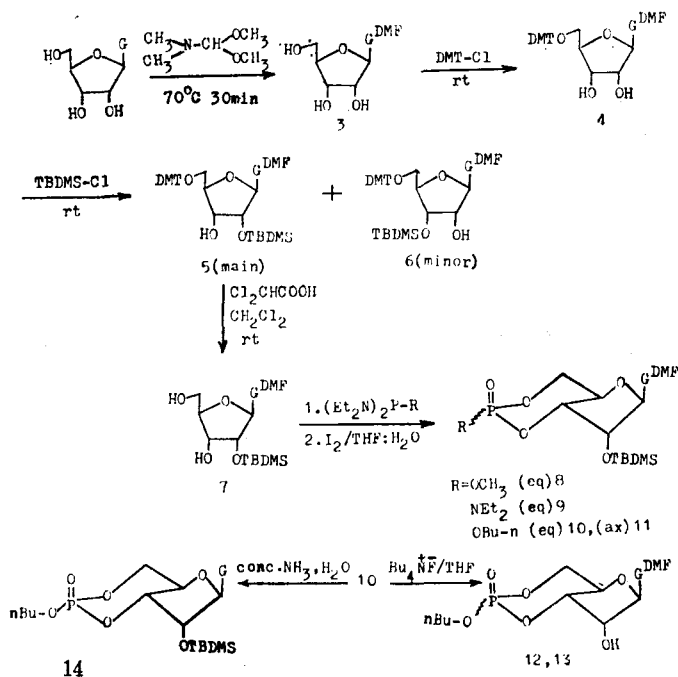
我们已报道了 cAMP 衍生物的合成及生物活性研究。通过活化 cAMP 的 P-O 键合成了 cAMP 磷酸酯和磷酰胺^(2,3) 并发现它们对肝癌、艾氏腹水癌细胞的 DNA 和 RNA 合成有较强的抑制作用。其中 cAMP 丁酯的立体异构体(1,2) 不仅抑制作用较明显, 且对肿瘤细胞膜的骨架成分有一定影响⁽⁴⁾。鉴于 cGMP 和 cAMP 在体内调节中的相互关系及它们结构上的



差异。在 cAMP 衍生物研究的基础上, 研究 cGMP 衍生物的合成及生物活性, 并寻找两者之间的关系显然是十分必要的。近年来, 在环核苷酸系统的研究中发现, cAMP 和 cGMP 的水平还受鸟嘌呤核苷酸调节蛋白 (简称 G 蛋白) 的影响; 即细胞表面的受体都是通过 G 蛋白把信息传递到相应的效应器酶上的⁽⁵⁾。而 cGMP 衍生物也可以考虑作为鸟嘌呤核苷酸的类似物, 对 G 蛋白起作用。

关于 cGMP 磷酸酯和磷酰胺的合成报道不多^(6~10)。且都是从 cGMP 开始, 用较强的活化试剂如 POCl₃, 苯磺酰氯或 PPh₃/CCl₄ 活化 P-O 键, 然后加入适当的胺合成磷酰胺, 或用重氮烷合成酯。由于 cGMP 的溶解度较差以及 P-O 键键能高, 活性低, 所以用上述方法合成, 收率极低。此外, cGMP 本身的合成也较困难, 收率也较低。本文利用前已报道的核苷的环亚磷酰化反应⁽¹¹⁾。用保护的鸟嘌呤核苷与三价磷试剂反应, 产物经 I₂ 氧化合成 cGMP 磷酸酯和磷酰胺。为合成 cGMP 的衍生物开辟了一条新的途径。

合成路线如下:



G=guanine, TBDMS-Cl=dimethyl-tert-butylsilyl chloride, DMT-Cl=4,4'-dimethoxytrityl chloride, $\text{G}^{\text{DMF}} = \text{N}^2$ -(N,N-dimethylamino)-methylene guanine

Scheme 1. Route of synthesis.

鸟嘌呤核苷在 DMF 中, 用 N,N -二甲基甲酰胺的甲缩醛, 70°C 下反应 30 min, 得到收率 70% 的化合物 3。3 用氯化 4,4'-二甲氧基三苯甲烷(DMT-Cl)在吡啶和 DMSO 中室温搅拌 12 h, 得到 5'-羟基保护的化合物 4, 收率 74%。化合物 4 的 2' 和 3'-羟基用氯化叔丁基二甲基硅烷(TBDMS-Cl)选择性地保护 2' 位, 得到主要产物 5 和次要产物 6。Ogilvie 等用 TBDMS 选择性地保护核苷的羟基⁽¹²⁾, 并发现 AgNO_3 可增加选择性, 而 Gholan 等用 N^2 -苯甲酰保护的鸟苷为原料重复以上实验时未得到理想的选择性⁽¹³⁾。在我们的反应中, 加 AgNO_3 后, 反应时间从 48 h 缩短至 2h, 但位置选择性无明显变化, 并发现鸟嘌呤 N^2 上的 (N,N -二甲胺基亚甲基) 保护基对糖环上羟基的选择性硅烷化比其它常用的保护基有利。化合物 5 和 6 经 MS, ^1H NMR、UV 分析, 被确定为一对异构体, 从 ^1H NMR 分析: 薄层分析中 R_f 值高的 5, 2'-H 的化学位移(4.45 ppm)比 6(4.52 ppm)在高场, 这是因为 2'-OH 上有大的硅保护所致。而 6 的 3'-H 化学位移(4.28 ppm)也比 5(4.35 ppm)的高。从而证明 5 为 2'-硅保护异构体。用 5 进一步反应, 环化的成功也证明了我们的判断。化合物 5 在二氯醋酸的二氯甲烷溶液中室温脱去 5'-OH 上的 DMT 保护基得到化合物 7, 收率 83%。化合物 7 与一系列三价磷试剂在常温、 N_2 保护下反应 2 h, 经 I_2 氧化, 得到化合物 8~11。反应是立体选择性进行的。8,9 只分出一个产物, 由于正丁酯的收率较高, 我们分离得到大量 10 以外, 还分到了少量磷原子构型不同的异构体 11。Engels 等指出⁽⁷⁾, 六元环状磷酸酯当烷氧基处于竖键时 ^{31}P NMR 化学位移在高场, 烷氧基在横键时 ^{31}P NMR 化学位移在低场。10 的 ^{31}P NMR δ 为 10.7 ppm, 11 的 δ 为 10.4 ppm。所以, 确定了化合物 10 是正丁烷氧基在横键的异构体, 11 是正丁烷氧基在竖键的异构体。8,9 由于没有相应的异构体对照, 因此, 没有建立磷原子的构型, 若按反应的一般情况分析, 也应为烷氧键处于横

键位置。化合物 10 在氟化四正丁胺的四氢呋喃溶液中脱 2'-OH 上的 TBDMS 保护基, 反应中发现在脱去 TBDMS 的同时, 磷原子的构型发生了转化, 结果得到磷原子构型不同的两个异构体 12 和 13。在脱保护基的过程中还发现鸟嘌呤核苷环磷酸酯或酰胺上的 N² 保护基一旦脱去, 产物溶解度即发生很大变化, 在一般溶剂中都很困难溶解。为了便于生物活性实验的进行, 产物最后保留 N² 上的保护基。化合物 5~14 均未有文献报道。

初步的生物实验如表 1、表 2 所示。

Tab 1. Effects of compounds (8~13) on the synthesis of DNA and RNA in tumor cell

Compd (10 ⁻⁴ mol/L)	% Inhibition of synthesis of DNA (hepatoma)	% Inhibition of synthesis of RNA (hepatoma)
1	64.9±14.4	54.5± 7.8
2	48.1± 3.9	59.0±11.6
10	69.0±13.4	58.0± 4.5
11	36.0±11.6	33.9± 7.3
8	47.9± 3.5	57.0± 6.1
9	95.0± 1.9	88.0± 1.7
12	23.9±11.8	13.8± 5.6
13	0.7±11.8	22.7± 6.5
cGMP monosodium salt	22.3±14.4	35.5± 3.5
cytosine arabinoside	95.0± 0.9	16.0±11.6

The above values are means±SD for three separate determinations, each determination being done in duplicate

Tab 2. Effectes of compounds 12 and 13 on the activity of adenylyl cyclase in osteoblastic cells ROS 17/2.8

Compd	Conc (μmol/L)	³ H-cAMP(dpm)	Compd	Conc(μmol/L)	³ H-cAMP(dpm)
Control		727±106	Control		845± 275
PTH	10	4232±205	PTH	10	6557± 803
12	150	3257± 30	13	150	1471± 288
PTH+12	10+150	11857±1100	PTH+13	10+150	9470±1394

dpm: Disintegration/min

The above values are means±SD for three separate determinations, each determination being done in triplicate.

表 1 是药物对 ³H-TdR 和 ³H-UdR 掺入小鼠肝癌细胞的 DNA 和 RNA 合成的影响。表 2 为药物 12 和 13 对大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的腺苷酸环化酶的影响。实验结果表明, 保护的 cGMP 丁酯与 cAMP 丁酯的抑制情况相似, 都是烷氧基横键异构体大于相应的竖键异构体。保护的 cGMP 甲酯和 N,N'-二乙基磷酸胺均有抑制作用。其中二乙基磷酸胺衍生物的抑制作用尤其突出。脱去 2'-OH 上保护基的产物 12 和 13 对 DNA 和 RNA 合成均无抑制作用。cGMP 钠盐在 10⁻⁴(mol/L) 浓度下也未表现出明显的作用。

甲状旁腺激素(PTH)可刺激成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的腺苷酸环化酶的活性。已知此过程是通过激活 G 蛋白而实现的。化合物 12 和 13 不但本身能刺激腺苷酸环化酶, 使 cAMP 水平增高, 而且与 PTH 同时用药有协同作用。从结构上看 12 和 13 是 5'-GMP 的衍

生物, 故我们推测可能对 G 蛋白有一定的影响。进一步的作用过程正在研究之中。

实 验 部 分

薄层层析用青岛海洋化工厂硅胶 GF₂₅₄, 柱层析用青岛海洋化工厂 100~200 目或 200~300 目硅胶。紫外光谱仪为 Du-7 型。FAB-MS 用 ZAB-HS 型质谱仪测定。NMR 用 FX-90 Q 及 VXR 300 测定, ³¹P NMR 以 85% H₃PO₄ 做内标。薄层层析展开剂为 CHCl₃-CH₃OH(9:1)。所有溶剂均经过干燥处理。减压浓缩均在 50°C 下进行。所有制得的化合物均为干糖浆, 薄层分析或 HPLC 分析均为单点或单峰。

N²-二甲胺基甲烯基鸟嘌呤核苷(3)

按照文献 14 的方法合成 1,1-二甲氧基二甲胺。再按照文献 15 的方法合成化合物 3
N²-二甲胺基甲烯基-5'- (4,4'-二甲氧基三苯甲基)鸟嘌呤核苷(4)

化合物 3 3 g (0.01 mol) 加到吡啶 15 ml 和 DMSO 15 ml 中, DMT-Cl 4 g (0.012 mol) 分三次加入。室温搅拌 12 h 后倒入冰水中, 析出固体, 过滤, 抽干。经硅胶柱层析, CHCl₃-CH₃OH(90:10) 洗脱, 得 4 5.2 g, 收率 74%。UVλ_{max}^{MeOH} nm 303.5, 280(sh), 233.5。FAB-MS m/z 640(M+1)⁺, 207(G^{DMF}+2H⁺)。¹H NMR(DMSO-d₆) δ ppm 8.58(s, 1H, N=CH-N), 8.00(s, 1H, C₈-H), 6.9~7.3(m, 13H, Ar-H), 5.85(d, 1H, J=4.5 Hz, C_{1'}-H), 5.25(m, 1H, C_{2'}-H), 4.5(m, 1H, C_{3'}-H), 4.2(m, 1H, C_{4'}-H), 4.04(m, 2H, C_{5'}-H), 3.69(s, 6H, OCH₃), 3.12(d, 6H, NCH₃)。

N²-二甲胺基甲烯基-5- (4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷(5及6)。

4 319 mg (0.5 mmol) 溶于 DMF 2 ml 和吡啶 2 ml 中, TBDMS-Cl 100 mg (0.7 mmol) 分两次加入, 室温搅拌 48 h 倒入冰水中, 滤出沉淀, 水洗、干燥, 粗品经硅胶柱层析, 用 CHCl₃-CH₃OH(98:2) 洗脱, 得化合物 5 226 mg, 收率 64%, Rf 0.58。另外分出化合物 6 64 mg, 收率 18%, Rf 0.50, 反应加 AgNO₃ 119 mg (0.7 mmol) 催化, 2 h 即完成, 得 Rf 0.58 产物 212 mg, 收率 60%; Rf 0.50 产物 70 mg, 收率 20%。5 和 6 UVλ_{max}^{MeOH} nm 303.5。FAB-MS m/z 755(M+1)⁺, 207(G^{DMF}+2H⁺)。化合物 5 ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 8.35(s, 1H, N=CH-N), 7.6(s, 1H, C₈-H), 6.75~7.25(m, 13H, Ar-H), 5.85(d, 1H, J=2.7 Hz, C_{1'}-H), 4.45(m, 1H, C_{2'}-H), 4.35(m, 1H, C_{3'}-H), 4.1(m, 1H, C_{4'}-H), 3.32(m, 2H, C_{5'}-H), 3.7(s, 6H, OCH₃), 3.0(d, 6H, NCH₃), 0.1(s, 6H, SiCH₃) 0.9(s, 9H, SiC(CH₃)₃)。化合物 6 相应位置 H 的 δ 值分别为: 8.35, 7.6, 6.75~7.25, 5.85(J=4.3 Hz), 4.52, 4.28, 3.95, 3.2, 3.7, 3.0, 0.1, 0.9。

N²-二甲胺基甲烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷(7)

5 200 mg 溶于少许 CH₂Cl₂ 中, 加入 5% Cl₂CHCOOH 的 CH₂Cl₂ 溶液 20 ml, 室温搅拌 15 min, 用 5% NaHCO₃ 水溶液、水分别洗涤, 直至 CH₂Cl₂ 层中性, 加无水 Na₂SO₄ 干燥后, 过滤、浓缩。用硅胶柱层析, CHCl₃-CH₃OH(97:3) 洗脱, 得化合物 7 100 mg, 收率 83%, Rf 0.39。UVλ_{max}^{MeOH} 301.5, FAB-MS m/z 453(M+1)⁺, 207。 ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 8.64(s, 1H, N=CH-N), 7.9(s, 1H, C₈-H), 5.8(d, 1H, J=6.3 Hz, C_{1'}-H), 5.18(t, 1H, J=4.5 Hz, C_{2'}-H), 4.5(s, 1H, C_{3'}-H), 3.79~4.07(m, 3H, C_{4'}, C_{5'}-H), 3.3(d, 6H, NCH₃), 0.9(s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.8~0.7(t, 6H, SiCH₃)

N²-二甲胺基甲烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3',5'-环磷酸酯(10和11)

化合物 7 90.4 mg (0.2 mmol), 四氮唑 35 mg (0.5 mmol), 溶于 DMF 2 ml 中, N₂ 气保

护下加入 $\text{BuO-P}(\text{NEt}_2)_2$ 140 μl (0.5 mmol) 反应 2 h 后, 用 I_2 液 (0.055 mol/L) 10 ml 氧化。反应物用乙酸乙酯提取, 水洗后, 加入无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 粗品经硅胶柱层析 CHCl_3 - CH_3OH (98:2) 洗脱后, 减压浓缩得化合物 11 (10 mg, Rf 0.58, 收率 8.8%) 和化合物 10 (80 mg Rf 0.50, 收率 70%)。10 和 11 的 $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 303.5。FAB-MS m/z 571 ($M+1$)⁺。化合物 10 ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 10.7。 ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.55 (d, 1 H, N=CH-N), 7.65 (s, 1 H, C_8 -H), 6.0 (s, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 5.8 (s, 1 H, $\text{C}_{2'}$ -H), 5.4 (t, 1 H, C_3 '-H), 4.14~4.28 (t, 2 H, J=7.2 Hz, OCH_2 -), 3.18 (d, 6 H, NCH₃), 4.8 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.3 (m, 3 H, CH₃), 0.9 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.15 (d, 6 H, SiCH₃)。化合物 11 ^{31}P NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 10.4。 ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.55 (d, 1 H, N=CH-N), 7.65 (s, 1 H, C_8 -H), 5.8 (m, 2 H, $\text{C}_{1'}$ -H, $\text{C}_{2'}$ -H), 4.9 (m, 2 H, C_3 '-H, C_4 '-H), 4.24~4.41 (t, 2 H, J=7.2 Hz, OCH_2 -), 4.12~4.22 (m, 2 H, C_5 '-H), 3.21 (d, 6 H, NCH₃), 1.7 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.3 (s, 3 H, CH₃), 0.9 (d, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.1 (m, 6 H, SiCH₃)。

N^2 -二甲胺基甲基烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸甲酯(8)

方法如上, 磷试剂改用 $\text{CH}_3\text{O-P}(\text{NEt}_2)_2$ 96 μl (0.5 mmol) 反应产物用硅胶精制 AcOEt - MeOH (94:6) 洗脱, 得化合物 8 10 mg, Rf 0.49。FAB-MS m/z , 529 ($M+1$)⁺, ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.5 (s, 1 H, N=CH-N), 7.46 (s, 1 H, C_8 -H), 5.02 (s, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 4.6 (d, 1 H, $\text{C}_{2'}$ -H), 4.39 (m, 1 H, C_3 '-H), 3.8 (d, 3 H, $J_{\text{P-H}}=10.8$ Hz, OCH_3), 3.1 (d, 6 H, NCH₃), 0.8 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.02 (s, 6 H, SiCH₃)。

N^2 -二甲胺基甲基烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸-N, N-二乙基磷酰胺(9)

方法如上, 7 135.6 mg (0.3 mmol), 磷试剂改用 $\text{P}(\text{NEt}_2)_3$, 210 μl (0.7 mmol), 产物用硅胶柱层析 AcOEt - MeOH (94:6) 洗脱得化合物 9 35 mg, Rf 0.51。FAB-MS m/z 570 ($M+1$)⁺。 ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.62 (s, 1 H, N=CH-N), 7.55 (s, 1 H, C_8 -H), 5.7 (s, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 4.2~4.6 (m, 3 H, $\text{C}_{2'}$, $3'$, $4'$ -H), 4.05 (q, 4 H, J=4.5 Hz, N-CH₂), 3.2 (d, 6 H, NCH₃), 1.1 (m, 6 H, J=4.5 Hz, CH₃-C), 0.82 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.01~0.02 (s, 6 H, SiCH₃)。

N^2 -二甲胺基甲基烯基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸丁酯(12 和 13)

化合物 10 290 mg 溶解于 1 ml/L Bu_4NF 的四氢呋喃溶液 1.5 ml 中, 室温搅拌 4 h, 抽去 THF, 残液用氯仿溶解, 30 ml 水洗涤, 干燥, 浓缩, 硅胶柱层析 CHCl_3 - CH_3OH (94:6) 洗脱, 得 50 mg 产品, 进一步用制备型 HPLC (0.78×20 cm, C 18 柱, 60% 甲醇洗脱) 纯化, 得两个产物 12 和 13。化合物 12 Rf 0.38, t_{R} (min) 21.4, 占 25%。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 302, 235.5。FAB-MS m/z 457 ($M+1$)⁺, ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.42 (s, H, N=CH-N), 7.64 (s, H, C_8 -H), 5.75 (m, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 5.01 (m, 1 H, $\text{C}_{2'}$ -H), 4.0 (m, 6 H, C_3 '-H, C_4 '-H, C_5 '-H, OCH_2) 3.2 (d, 6 H, NCH₃), 1.2 (m, 7 H, CH₃-, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。化合物 13, Rf 0.36, t_{R} (min) 25.6, 占 46%。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 302, 235.5。FAB-MS m/z , 457 ($M+1$)⁺, ^1H NMR (CDCl_3) δ_{ppm} 8.42 (s, 1 H, N=CH-N), 7.62 (s, 1 H, C_8 -H), 5.75 (m, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 5.0 (m, 2 H, $\text{C}_{2'}$ -H, C_3 '-H), 4.42 (s, 1 H, $\text{C}_{1'}$ -H), 4.0 (m, 4 H, OCH_2 -, C_5 '-H), 3.2 (d, 6 H, NCH₃), 1.2 (m, 7 H, CH₃-, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。

2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷 3', 5'-环磷酸丁酯(14)

化合物 10 150 mg 溶于甲醇 2 ml 中, 加入浓氨水 25 ml, 室温搅拌 36 h, 减压浓缩,

硅胶柱层析 CHCl_3 - CH_3OH (95:5) 洗脱, 得主要成分 45 mg, Rf 0.34, 收率 30%。

$\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm 255.0. FAB-MS m/z , 516($M+1$)⁺, 152 ($G+2H$)⁺. ¹HNMR (CD_3COCD_3) δ ppm 7.90(s, 1 H, C_8 -H), 5.96(s, 1 H, C_1' -H), 4.86 (s, 1 H, C_2' -H), 4.65 (s, 1 H, C_3' -H), 4.10(m, 1 H, C_2' -H), 4.7(m, 2 H, OCH_2 -) 1.2(m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.9 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.2(s, 6 H, SiCH_3).

药物对 ³H-TdR 和 ³H-UdR 掺入细胞 DNA 和 RNA 合成的影响

一. 肝癌腹水细胞的收集和培养

昆明种小白鼠, 体重 20 g 左右, 按常规方法接种, d 7 处死小鼠, 吸出腹水置生理盐水中, 轻轻振荡后, 离心 4000 r/min, 5min, 如此洗涤细胞 2 次, 然后放入 Eagle 培养液中 (pH 7.4)。用白细胞计算法求得细胞浓度, 本实验所用细胞浓度约为 10^7 cell/ml。

二. ³H-TdR 和 ³H-UdR 的掺入实验

Eagle 培养液 0.9 ml 中分别含细胞 10^7 个和样品 10^{-4} mol/L, 加入 ³H-TdR 和 ³H-UdR 1 μCi (含于 0.1 ml Eagle 液中)。置于 37°C 温箱中孵育 3h 后, 立即放入冰浴中停止反应。将每管反应液转移到 49-型玻璃纤维滤纸抽滤, 用生理盐水 10 ml, 三氯醋酸 5 ml 洗涤, 乙醇 2 ml 将滤纸抽干, 于 80°C 红外灯下烘干。闪烁液为含 0.3% TP, 0.03% POPOP 的二甲苯溶液。测出每个样品的 cpm 值 (即每分钟计算值), 以对照管计数率为 100%, 计算掺入率, 每个样品均重复 3 次, 每组均重复 2 次。

腺苷酸环化酶的分析

用大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8, 接种于 24 孔板, 加 ³H-adenine, 温育 2 h, 使生成 ³H-ATP⁽¹⁶⁾。加入 IBMX 抑制磷酸二酯酶的活性, 加待测样品继续保温 15 min。使 ³H-ATP 成为 ³H-cAMP, 经 Dowex AG 50 和 Al_2O_3 柱分离, 定量测定 ³H-cAMP 生成量 (以每分钟衰变数衡量)。以 ¹⁴C-cAMP 作回收率测定。³H-cAMP 的量反映腺苷酸环化酶的活性。

致谢 北京医科大学仪器分析中心及药学院分析中心测定化合物光谱。北京医科大学药学院李长岑和基础医学院路明, 李屏风指导和协助完成化合物的生物活性测定。

参 考 文 献

1. Miller JP. Cyclic nucleotide analogues. in: Cramer H and Schultz J, ed. *Cyclic 3',5'-nucleotides Mechanism of Action*. New York: John Wiley & Sons. 1977; 77.
2. 王 序、张礼和. 环状核苷酸及其衍生物的合成. 药学报 1980; 15:396.
3. 张礼和, 等. 环状核苷酸衍生物的合成. 高等学校化学学报 1985; 6:903.
4. 张礼和, 等. 环状核苷酸的磷酸酯. 磷酸胺的合成及其生物活性的研究. 科学通报 1984; 13:820.
5. Houslay MD. I_01 channels controlled by guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 1987; 12:167.
6. Meyer RB, et al. Synthesis of purine nucleoside 3', 5'-cyclic phosphoramidates. *Tetrahedron Lett* 1973; 4:269
7. Engels J. Synthesis and reactivity of guanosine 3', 5'-phosphoric acid alkyl esters. *Bioorg Chem* 1979; 8:9.
8. Engels J and Reidys R. Synthesis and application of the photolabile guanosine 3', 5'-phosphoric-O-nitro-benzylester. *Experientia* 1978; 34:14.
9. Wesley G, et al. A simple method for the preparation of the individual diastereoisomers of ribonucleoside 3', 5'-cyclic N, N'-dimethyl phosphoramidates. *Synthesis* 1984:27.

10. 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'-deoxy-uridine 3', 5'-cyclic N-benzyl phosphoramidate. *J Org Chem* 1985; **50**:1271.
11. 吴劲昌, 等. 腺嘌呤核苷的环磷酰化反应. 化学学报 1986; **44**: 635.
12. Ogilvie KK, et al. The synthesis of oligoribonucleotides II. The use of silyl protecting groups in nucleosides and nucleotides chemistry VII. *Can J Chem* 1978; **56**:2768.
13. Gholam HH, et al. New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleotides. *Ibid* 1982; **60**:1106.
14. Arnold Z, et al. Reactivity of 1, 1-dialkoxymethylamines. *Collec Czech Chem Commun* 1964; **29**:264.
15. Zemlicka J, et al. Preparation of N-dimethylamine methylene derivatives—A new method of a selective substitution of nucleoside amino groups. *Ibid* 1967; **32**:3159.
16. Rodan SB, et al. Factors associated with humoral hypercalcemia of malignancy stimulate adenylate cyclase in osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1983; **77**:1511.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF DERIVATIVES OF GUANOSINE 3', 5'-CYCLIC PHOSPHATE

HY Cai and LH Zhang

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

ABSTRACT Methyl, n-butyl 2'-TBDMS-N²-DMF-guanosine 3', 5'-cyclic phosphate and 2'-TBDMS-N²-DMF-guanosine 3', 5'-cyclic diethyl-phosphoramidate were synthesized by reaction of protected guanosine with trivalent phosphorus reagents in the presence of tetrazole followed by oxidation. The reaction occurred stereospecifically.

Protected guanosine 3', 5'-cyclic phosphotriesters and N, N'-diethyl-phosphoramidate were shown to have inhibitory activity on the synthesis of DNA and RNA in mouse liver tumor cell. Diastereoisomers of n-butyl N²-substituted guanosine 3', 5'-cyclic phosphate have been shown to activate adenylate cyclase *in vitro*.

Key words Guanosine 3', 5'-cyclic phosphate and phosphoramidate; Adenylate cyclase