

## Структурні особливості 6-азацитидину та його похідних: дані ПМР та ІЧ спектроскопії

С. П. Самійленко, І. В. Алексеєва, Л. Г. Пальчиківська, І. В. Кондратюк,  
А. В. Степанюгін, А. С. Шаламай, Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

*Методами ІЧ спектроскопії та ПМР досліджено 6-азаCyt, 6-азаC та низку їхніх похідних і споріднених сполук. Дублетне розщеплення сигналу аміногрупи 6-азаCyt у спектрах ПМР, відсутнє в спектрах канонічної основи Cyt та нуклеозидів C і dC за ідентичних умов експерименту, свідчить про більшу нееквівалентність амінопротонів, зумовлену більшою асиметрією електронної будови, котра зростає при заміщенні кільця в положеннях 1 і 5, та підвищений бар'єр обертання аміногрупи. Низькопольова компонента дублету малочутлива до 5-метилзаміщення, що, очевидно, пов'язане із втягненням одного з амінопротонів у внутрішньомолекулярний H-зв'язок з атомом N3. Показано зворотню (порівняно з Cyt) специфічність взаємодії 6-азаCyt щодо карбоксильної групи амінокислот та карбксилат-іона у безводному DMSO. Дані ІЧ спектроскопії підтверджують існування досліджених сполук з незаміщеною аміногрупою в DMSO та твердій фазі у формі кето-амінних таутомерів.*

**Вступ.** Аномальний нуклеозид 6-азацитидин (6-azaC) є антиметаболітом нуклеїнового обміну та перспективним препаратом широкої терапевтичної дії. Описання його хімічного синтезу та перші вказівки на онкостатичний ефект з'явилися у літературі в кінці 50-х — на початку 60-х років ([1] та наведені там посилання). Після цього в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України було розроблено оригінальні препаративні методи синтезу 6-azaC, котрі є передумовою створення промислової технології виробництва препарату [2, 3]. В експериментах на тваринах виявилася висока протипухлинна та антилейкозна активність 6-azaC щодо широкого спектра перешеплюваних пухлин та лейкозів [4]. На культурі тканини було продемонстровано дію препарату як інгібітора вірусної репродукції [5]. Дослідження фармакокінетики 6-azaC [6] свідчить про значне уповільнення виведення його з крові порівняно з іншими антиметаболітами (до того ж набагато токсичнішими), а також низьку метаболічну трансформацію, що до-

зволяє рекомендувати цей препарат для застосування із введенням з більшими інтервалами для підтримання необхідної концентрації. Окрім того, спеціальним дослідженням токсико-фармакологічних властивостей [7] показано, що, на відміну від більшості протипухлинних препаратів алкілюючої дії та інших антиметаболітів, 6-azaC при багаторазовому введенні в терапевтичних дозах не впливає суттєво на кровотвірну здатність тварин. При детальному вивченні впливу препарату на розмноження аденовірусів I та II типів *in vitro* [8, 9] встановлено, що він пригнічує репродукцію аденовірусу в широких концентраційних межах та з високим хіміотерапевтичним індексом, впливаючи на синтез вірусної ДНК, структурних вірусних та індукованих вірусом поліпептидів, імунологічно активних вірусних білків, а також на появу характерних внутрішньоядерних утворень із вмістом ДНК. До того ж було відзначено його імуностимулюючий ефект, який проявився у підсиленні функціональної активності природних кілерів та фагоцитарних клітин [9]. Достатньо високу антимікотичну дію 6-azaC продемонстровано при дослідженні його впливу на ріст молюсків урогенітального тракту людини, які є потенційними кофакторами вірусу

© С. П. САМІЙЛЕНКО, І. В. АЛЕКСЕЄВА,  
Л. Г. ПАЛЬЧИКІВСЬКА, І. В. КОНДРАТЮК,  
А. В. СТЕПАНЮГІН, А. С. ШАЛАМАЙ,  
Д. М. ГОВОРУН, 1997

імунодефіциту людини [10]. І вже зовсім недавно синтезовано низку N4-амінокислотних похідних 6-azaC та отримано перші дані про їхню протівірусну активність [11].

Отже, аномальний нуклеозид 6-azaC є антитаболітом з широким спектром терапевтичної активності, малотоксичним препаратом подовженої дії, до того ж з імуностимулюючими властивостями. Проте, наскільки відомо авторам, дані про його структурні особливості і фізико-хімічні властивості, що зумовлюють детальні механізми терапевтичної дії, обмежуються однією роботою 33-річної давності [12]. Змістом згаданої роботи є вивчення спектрів ПМР та ІЧ спектрів поглинання 6-azaC, низки його похідних та споріднених сполук з метою дослідження їхніх фізико-хімічних характеристик, що можуть бути відповідальними за терапевтичний ефект.

**Матеріали і методи.** В роботі використано такі реактиви: цитозин (Cyt), 5-метилцитозин ( $m^5$ Cyt) та 5-азацитидин (5-azaC) фірми «Calbiochem» (США); 6-азацитозин (6-azaCyt) та 5-метил-6-азацитозин ( $m^5$ -6-azaCyt) («Chemapol», Чехія) з подальшою перекристалізацією; N-форміл-аспарагинова кислота (f-Asp) («Serva», ФРН); ацетат натрію (NaAc) («Рехим», Росія). За методом [13] синтезовано 6-азацитидин (6-azaC), 5-метил-6-азацитидин ( $m^5$ -6-azaC), 1-тетрагідрофураніл-6-азацитозин (1-fur-6-azaCyt), 1-тетрагідрофураніл-5-метил-6-азацитозин (1-fur- $m^5$ -6-azaCyt), 1,N4-ди(тетрагідрофураніл)-6-азацитозин (1,N4-fur<sub>2</sub>-6-azaCyt), N3-(2-гідроксметоксиметил)-6-азацитозин (N3-hem-6-azaCyt) та 5-метил-6-азацитидин з розщепленням C2'-C3'-зв'язком ( $m^5$ -6-azaC(seco)). За методикою [14] було синтезовано 2'-дезоксi-6-азацитидин (6-azadC), а 5-бром-6-азацитидин (br<sup>5</sup>-6-azaC) — за методикою [15]. Синтез N4-метилкарбамоїл-6-азацитидину (N4-cbm-6-azaC) та N4-ацетил-6-аза-триацетил-цитидину (N4-ac-6-azaC(ac)<sub>3</sub>) описано в [2]. Спектри ПМР розчинів зазначених сполук в DMSO-d<sub>6</sub> («Fluka», ФРН) реєстрували на спектрометрі Gemini-200 і VXR-300 («Varian», США) в ампулах з діаметром 5 мм; хімсудви протонних резонансів наведено в мільйонних частках (м. ч.) відносно TMS як внутрішнього стандарту. ІЧ спектри розчинів в DMSO («Fluka») та запресованих у таблетках з KBr («Aldrich», США) сполук отримували за допомогою спектрометра Spacord M80 («Carl Zeiss», ФРН). У першому випадку користувалися кюветами з CaF<sub>2</sub> товщиною 0,1 мм. Обидва розчинники висушували над молекулярними ситами 0,4 та 0,5 нм («Serva»). Концентрація розчинів у всіх експериментах залишалася постійною і дорівнювала 30 мМ.

**Результати та обговорення.** Спектри ПМР, ІЧ поглинання та Раманівського розсіяння цитозину і його нуклеозидів, а також їхніх комплексів з карбоксильною групою амінокислот вивчалися раніше [16—21]. Аміногрупа канонічного цитозину, цитидину і дезоксицитидину в спектрі ПМР дає синглетний сигнал 7,03; 7,13 та 7,094 м. ч. відповідно [16]. Лише у випадку 5-метилпохідних  $m_2^{1,5}$ Cyt та  $m^5$ dCyt спостерігали дублети з розщепленням 0,320 та 0,420 м. ч. відповідно (зазначимо, що в цитованій роботі в табл. 1 наведено середні значення хімсудів дублетів аміногрупи вказаних похідних Cyt та їхніх комплексів з карбоксильною групою амінокислот та карбоксилат-іона).

Заміна атома вуглецю в шостому положенні цитозину на атом азоту викликає значні зміни в спектрі ПМР (табл. 1). Аміногрупі 6-azaC відповідає дублет 7,734 та 7,687 м. ч., розташування котрого свідчить про більшу дезекранованість протонів та зростання кислотних властивостей аміногрупи 6-azaC порівняно до Cyt. Саме розщеплення сигналу аміногрупи 6-azaC, ймовірно, обумовлене нееквівалентністю її протонів, котра може завдячувати перерозподілові заряду в кільці цитозину при 6-аза-заміщенні в напрямі більшої асиметрії, та вищим, ніж в канонічній основі, бар'єром обертанням аміногрупи [22, 23]. Сигнали сусідніх з атомом N6 протонів N1H та C5H також зсунуті в бік низьких полів більше ніж на одну мільйонну частку, що також свідчить про зростання кислотності відповідних груп. Заміщення атома водню в першому положенні на рибозильну та фуранідильну групи призводить до збільшення відстані між компонентами дублету аміногрупи приблизно вдвічі, що, скоріш за все, обумовлено поглибленням нееквівалентності протонів аміногрупи. Зазначимо, що поки що незрозуміло, чому аміногрупа 6-azadC дає синглетний сигнал 7,831 м. ч. Очевидно, тут потрібні додаткові дослідження.

Щодо впливу на дублет аміногрупи, радикальним виявилася наявність метильного залишку в положенні 5 кільця 6-azaC: розщеплення збільшується приблизно на 0,450 м. ч. (тобто того ж порядку величини, що й для  $m^5$ dC). Характерно, що величини розщеплення дублету аміногрупи для 1-fur- $m^5$ -6-azaCyt,  $m^5$ -6-azaCyt(seco) та  $m^5$ -6-azaC практично збігаються, тобто розщеплення не залежить від природи замісника при атомі аглікону N1. При порівнянні величин розщеплення аміногрупи 6-azaCyt з  $m^5$ -6-azaCyt, 6-azaC з  $m^5$ -6-azaC та 1-fur-6-azaCyt з 1-fur- $m^5$ -6-azaCyt спадає на думку адитивність впливу замісників в першому та п'ятому положеннях гетероциклу на величину відстані між компонентами дублету.

Таблиця 1

Хімічні зсуви аміногрупи та деяких інших груп у спектрах ПМР цитозину, 6-азацитозину та його похідних (м. ч.) відносно TMS в 30 мМ розчинах в DMSO

Сполука	NH <sub>2</sub>			C <sub>5</sub> H	C <sub>6</sub> H	N <sub>1</sub> H
	$\delta_1$	$\delta_2$	$\Delta$			
Cyt	7,033	—	0	5,559	7,316	10,390
6-azaCyt	7,734	7,685	0,049	7,347	—	11,951
m <sup>5</sup> -6-azaCyt	7,848	7,367	0,481	—	—	11,740
6-azaC	8,017	7,911	0,106	7,526	—	—
m <sup>5</sup> -6-azaC	8,066	7,499	0,567	—	—	—
6-azadC	7,831	—	0	7,504	—	—
1-fur-6-azaCyt	7,922	7,830	0,092	7,468	—	—
1-fur-m <sup>5</sup> -6-azaCyt	7,982	7,428	0,554	—	—	—
m <sup>5</sup> -6-azaC(seco)	8,000	7,447	0,553	—	—	—
br <sup>5</sup> -6-azaC	8,612	7,727	0,885	—	—	—
5-azaC	7,529	7,511	0,018	—	8,578	—
N4-ac-6-azaC(ac) <sub>3</sub>	11,560	—	—	8,726	—	—
N3-hem-6-azaCyt	8,626	—	—	7,418	—	11,705
N4-cbm-6-azaC	8,644	—	—	7,638	—	—

П р и м і т к а.  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  — компоненти дублету сигналу аміногрупи;  $\Delta$  — величина дублетного розщеплення сигналу аміногрупи.

При аналізі розташування компонентів дублету 6-azaCyt та його зазначених похідних впадає в око цікава особливість: 5-метилзаміщення практично не впливає на хімічний зсув низькопольової компоненти, а самі збільшення розщеплення зумовлене зміщенням високопольової компоненти в бік високих полів. Така поведінка дублетного сигналу аміногрупи похідних 6-azaCyt може стати зрозумілішою, якщо припустити по аналогії з Cyt [24], що один з амінопротонів (якому відповідає більше значення хімзсуву) втягнуто у внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з атомом N3. Для Cyt квантовохімічна оцінка структури [23, 24] свідчить про нееквівалентність його амінопротонів (хоча за вибраних умов реєстрації спектрів ПМР обумовленою нееквівалентністю розщеплення сигналу протонів аміногрупи не спостерігалось) та пов'язані з нею внутрішньомолекулярний Н-зв'язок N4H...N3 і анізотропія обертання аміногрупи навколо екзоциклічного зв'язку С-N з переважною орієнтацією вільної електронної пари атома азоту аміногрупи в перехідному стані в бік атома водню С5Н. Отже, для 6-azaCyt слід очікувати більшу анізотропію обертання аміногрупи та міцніший внутрішньомолекулярний зв'язок. Підвищення

кислотності аміногрупи 6-azaCyt у порівнянні з Cyt може свідчити про меншу її пірамідальність, ніж у Cyt, як у геометричному (кут нахилу площини ННН до екзоциклічного зв'язку С-N), так і в енергетичному сенсі (бар'єр площинної інверсії).

Зауважимо, що вільний від водневого зв'язку протон з меншим значенням хімзсуву чутливіше реагує на електронодонорні властивості метильної групи (див. табл. 1).

Максимум розщеплення сигналу аміногрупи (0,885 м. ч.) спостерігається у випадку br<sup>5</sup>-6-azaC. Висока електроноакцепторність атома бром, спричиняючи значну асиметричну деформацію електронної структури кільця та втягування сусіднього з ним амінопротона у досить сильний внутрішньомолекулярний Н-зв'язок, збільшує нееквівалентність протонів та бар'єр обертання аміногрупи з переважною орієнтацією вільної електронної пари амінного атома азоту, протилежно до напрямку орієнтації у випадку 6-azaCyt та Cyt. При цьому більші зміни спостерігаються для низькопольової компоненти, хімзсув якої збільшується майже на 0,9 м. ч., а відповідний йому протон, дезекрануючись, набуває більш кислотних властивостей. Відзначимо, що менше в 5—6 разів розщеплення

сигналу аміногрупи 5-azaC порівняно з 6-azaC, очевидно, відбиває більшу симетрію внутрішнього оточення аміногрупи і, отже, меншу різницю в екрануванні амінопротонів.

При зв'язуванні гідроксietоксиметильного фрагмента з атомом N3 6-azaCyt внаслідок перебування кільця аміногрупа перетворюється в іміногрупу із хімізсувом імінопротона 8,626 м. ч., а протон іміногрупи NH при цьому дещо підкислюється.

Монозаміщення аміногрупи метилкарбамоїльним та ацетильним радикалами в N4-cbm-6-azaC та N4-ac-6-azaC(ac)<sub>3</sub> викликає значне зміщення сигналу амінопротона в бік низьких полів до значення хімізсувів 8,626 та 11,560 м. ч. відповідно. В останньому випадку не виключено перетворення аміногрупи на іміно- з переходом протона, що вивільняється, на атом N3 або ж втягнення амінопротона у сильний Н-зв'язок. Зміщення сигналу протона C5H більш ніж на 1 м. ч. до низьких полів може бути свідченням його залучення до внутрішньомолекулярного зв'язку з карбонільною групою ацетильного залишку в четвертому положенні.

Незвично велике розщеплення сигналу протонів аміногрупи в спектрах ПМР низки похідних 6-azaCyt стало підґрунтям для припущення, що маємо справу не з нееквівалентними амінопротонами, а з двома імінопротонами N4H та N3H. Це спонукало нас вдатися до ІЧ спектроскопії. У табл. 2 наведено ІЧ спектри досліджуваних сполук в розчинах у DMSO та в кристалічному стані.

Зазначимо, що аміногрупа, котра може виступати як донором, так і акцептором протонів при утворенні водневих зв'язків [25], та її агрегаційні властивості достатньо вивчалися засобами ІЧ спектроскопії [26—36].

На наш погляд, вельми цікавою властивістю аміногрупи є її здатність здійснювати низькоенергетичні інверсні коливання великої амплітуди, що є суто нелінійними та чутливими як до внутрішньомолекулярного, так і до зовнішнього оточення. Квантовохімічні засади інверсії та анізотропії обертального руху аміногрупи основ у структурі та функціонуванні ДНК обговорюються у роботах [37—42].

Літературні джерела [26—36] свідчать, що аміногрупа в розчинниках різної полярності в області валентних коливань дає дві смуги, що відповідають більш високочастотному антисиметричному коливанню  $\nu_{as}(\text{NH})$  в інтервалі 3400—3250  $\text{cm}^{-1}$  та симетричному коливанню  $\nu_s(\text{NH})$  в інтервалі 3250—3100  $\text{cm}^{-1}$ . Крім того, при наближенні подвійного значення частоти деформаційних ножицних коливань  $\alpha(\text{NH}_2)$  (область 1600—1700  $\text{cm}^{-1}$ ) до частоти  $\nu_s(\text{NH})$  у цій ділянці спектра можна спостерігати смугу, обумовлену резонансом Фермі між  $\nu_s(\text{NH})$  та першим обертоном  $\alpha(\text{NH}_2)$  [28, 32, 34].

В отриманих нами ІЧ спектрах як розчинів, так і кристалічної фази 6-azaCyt, його похідних та споріднених з ним молекул з незаміщеною аміногрупою присутні дві смуги, що можуть бути відне-

Таблиця 2

Коливальні частоти ( $\text{cm}^{-1}$ ) аміно- та карбонільної груп цитозину, 6-азацитидину, його похідних та споріднених сполук в ІЧ спектрах розчинів в DMSO та запресованих таблеток з KBr

Сполука	Розчин					Кристалічна фаза				
	$\nu_{as}(\text{NH})$	$\nu_s(\text{NH})$	$\nu_{sfr}$	$\alpha(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{as}(\text{NH})$	$\nu_s(\text{NH})$	$\nu_{sfr}$	$\alpha(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{O})$
Cyt	3330	3195	—	1635	1660	3383	3118	3172	1634	1661
m <sup>5</sup> Cyt	3280	3180	3250	1637	1660	3230	3100	—	1620	1670
6-azaCyt	3295	3100	3150	1600	1655	3330	3150	—	1595	1650
m <sup>5</sup> -6-azaCyt	—	—	—	—	—	3230	3260	—	1600	1655
6-azaC	3290	3160	—	1606	1648	3340	3195	—	—	1670
m <sup>5</sup> -6-azaC	3310	3150	—	1610	1648	3360	3170	3260	1640	1658/1677
1-fur-6-azaCyt	3300	3150	—	1605	1650	3330	3150	—	1595	1650
1-fur-m <sup>5</sup> -6-azaCyt	3360	3165	—	1608	1645	3340	3150	—	1615	1660
m <sup>5</sup> -6-azaC(seco)	3300	3170	—	1643	1673	3360	3200	—	1628	1666
5-azaC	—	3100	3280	1660	1660	3380	—	3270	1650	1685
br <sup>5</sup> -6-azaC	3270	—	—	—	1648	3350	3170	—	1620	1670
1,N4-fur <sub>2</sub> -6-azaCyt	3160	—	—	—	1670	3150	—	—	—	1655

сені до  $\nu_{as}(\text{NH})$  та  $\nu_s(\text{NH})$  (див. табл. 2). У деяких випадках зареєстровано і Фермі-резонансну компоненту  $\nu_{str}$ . На ділянці спектра 1600—1700  $\text{cm}^{-1}$  поряд із смугою валентних коливань карбонільного зв'язку  $\nu(\text{C}=\text{O})$  спостерігається інтенсивна смуга ножичних коливань аміногрупи  $\alpha(\text{NH}_2)$ .

Отже, існування 6-azaCyt та його похідних в кето-амінійній формі сумніву не викликає. Що ж до  $\text{Br}^5$ -6-azaC, то наявність однієї смуги 3270  $\text{cm}^{-1}$  підкріплює висновок, зроблений на підставі даних ПМР про наявність сильного внутрішньомолекулярного Н-зв'язку між амінім атомом водню і сусіднім з ним атомом бромю. Втім не можна виключати і можливу аміно-імінну рівновагу.

Вкажемо на характерне збурення частот фундаментальних коливань аміногрупи Cyt та його похідних при переході з вільного (ізолюваного) стану до розчину DMSO. Спостерігається значне зниження (на 240—275  $\text{cm}^{-1}$ ) частот валентних коливань  $\nu_{as}(\text{NH})$  і  $\nu_s(\text{NH})$  та помітне підвищення (на 35—50  $\text{cm}^{-1}$ ) частоти деформаційного ножичного коливання  $\alpha(\text{NH}_2)$ . У вільному стані (ізоляція у низькотемпературній аргонівій матриці) ці смуги знаходяться на частотах:  $\nu_{as}(\text{NH}) = 3564 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_s(\text{NH}) = 3441 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha(\text{NH}_2) = 1598 \text{ cm}^{-1}$  для Cyt [43] і  $\nu_{as}(\text{NH}) = 3564 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_s(\text{NH}) = 3447 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha(\text{NH}_2) = 1586 \text{ cm}^{-1}$  для  $\text{m}^5\text{Cyt}$  [44]. Така поведінка частот коливання аміногрупи однозначно вказує на специфічну сольватацію цих основ DMSO за допомогою досить сильних міжмолекулярних водневих зв'язків  $\text{N4H}\dots\text{O}=\text{S}$  з ентальпією 18,4 і 19,19 кДж/моль для кожного з аміних зв'язків  $\text{N4H}$  Cyt і  $\text{m}^5\text{Cyt}$  відповідно (оцінку здійснено методом спектральної калориметрії [45]). Для імінних зв'язків  $\text{N1H}$  очікується більша енергія водневого зв'язування з DMSO, оскільки їхня кислотність значно вища, ніж аміних [46]. Для порівняння зазначимо, що у кристалічному стані аміногрупа Cyt втягується у горизонтальні Н-зв'язки з ентальпією 14,7÷16,4 кДж/моль на один зв'язок [47]. На жаль, такий детальний аналіз впливу оточення (розчинника та сусідів по кристалічній ґратці) на ІЧ спектр досліджуваних 6-azaCyt, 6-azaC та їхніх похідних провести не можна за відсутністю даних для ізолюваних молекул. Проте з високою вірогідністю можна стверджувати, що аналогічні причини впливають на формування спектрів їхніх розчинів в DMSO та кристалів.

Оцінку ентальпії специфічної сольватації DMSO аміногрупи Cyt можна розглядати як оцінку низу аналогічної величини для 6-azaCyt, оскільки аміногрупа останнього характеризується більшою кислотністю, ніж аміногрупа Cyt.

Слід вказати, що реєстрація ІЧ спектрів у

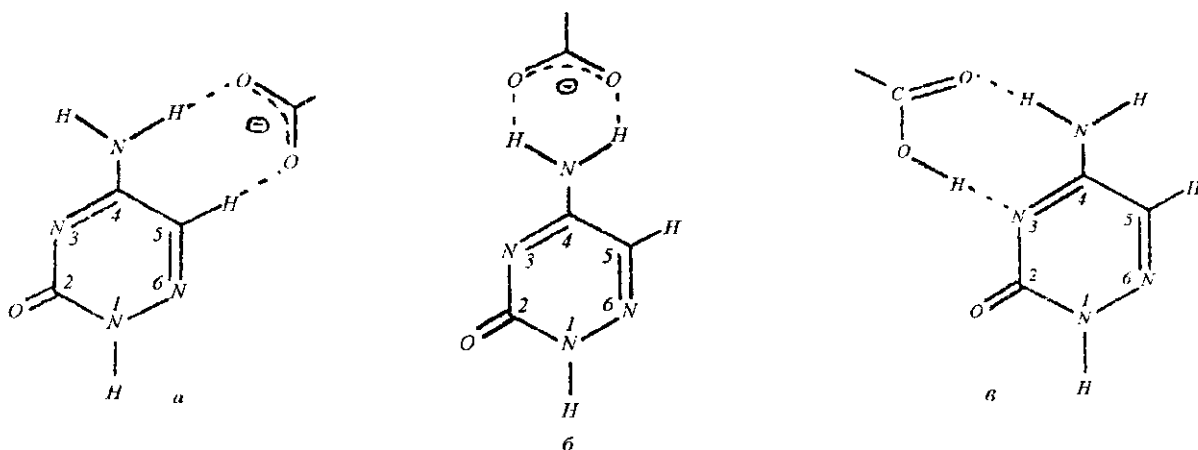
високочастотній області як в DMSO, так і в таблетках КВг пов'язана з певними труднощами. В обох випадках в області 3500—3300  $\text{cm}^{-1}$  накладаються широкі смуги валентних коливань води, яка охоче поглинається як DMSO, так і КВг. Окрім того, на робочий інтервал частково накладається «хвіст» поглинання DMSO.

Тому наведені нами дані дослідження сполук 6-азацитозинового ряду за допомогою ІЧ спектроскопії слід розглядати як попередні, котрі можуть бути уточнені та деталізовані при використанні інших розчинників або їхніх сумішей, що буде предметом подальшої роботи. При цьому можна буде отримати значно більше інформації про деталі структури досліджуваних сполук.

Як своєрідний зонд електронної структури 6-azaCyt та його комплексотвірної здатності можна розглядати вивчення за допомогою ПМР його взаємодії з карбоксильною групою амінокислоти та карбоксилат-іоном.

Раніше було досліджено специфіку взаємодії канонічного цитозину з карбоксильною групою амінокислот в нейтральній (f-Asp) та депротонованій (NaAc, карбоксилат-іон) формах ([16—19]. Порівняння даних ПМР щодо комплексотвірної здатності Cyt та 6-azaCyt і зазначеними лігандами наведено в табл. 3. Було показано, що Cyt є єдиною основою серед канонічних основ, що утворює в DMSO комплекси (з перенесенням протона від кислоти до основи) з нейтральною карбоксильною групою, та набагато слабше взаємодіє з карбоксилат-іоном [48, 49].

Отримані нами дані свідчать про суттєво слабшу взаємодію 6-azaCyt з обома лігандами у порівнянні з Cyt. Крім того, специфічність щодо взаємодії з обома формами карбоксильної групи є зворотною в порівнянні з канонічною основою. У спектрі ПМР комплексу з карбоксилат-іоном аміногрупа дає дешо розширений симетричний сигнал, зміщений на різну відстань від компонентів дублету. Беручи до уваги, що низькопольове зміщення сигналу протона  $\text{C5H}$  має той самий порядок, можна зробити висновок, що карбоксилат-іон утворює комплекси з 6-azaCyt через два Н-зв'язки двох типів (рисунок): із залученням одного протона аміногрупи та протона  $\text{C5H}$  (а) або двох протонів аміногрупи (б). Для Cyt показано [50], що перший комплекс є енергетично вигіднішим. Сигнал аміногрупи комплексу 6-azaCyt з нейтральною карбоксильною групою не є симетричним. Аналіз контуру дозволяє припустити, що низькопольова компонента залишається на місці у вигляді плеча на фоні зміщеного до низьких полів низькочастотного компонента. Очевидно, слабка взаємодія з кар-



Структура комплексів, утворених 6-азаCyt з карбоксилат-іоном (а, б) та карбоксильною групою (е) у безводному DMSO

Таблиця 3

Хімічні зсуви протонів цитозину і 6-азацитозину та їхні зміни ( $\Delta$ ) в 30 мМ еквімолярних сумішах з NaAc та f-Asp у DMSO (м. ч.) відносно TMS

Сполука	Ізольована	В суміші з			
		NaAc	$\Delta$	f-Asp	$\Delta$
Cyt					
N <sub>1</sub> H	10,390	10,510	+0,120	Дуже широкий	
NH <sub>2</sub>	7,033	7,037	+0,004	7,270	+0,237
C <sub>5</sub> H	5,559	5,570	+0,011	5,608	+0,047
C <sub>6</sub> H	7,316	7,316	+0,011	7,368	+0,052
6-aza-Cyt					
N <sub>1</sub> H	11,951	11,960, широкий	+0,009	11,959	+0,008
NH <sub>2</sub>	7,737	7,780	+0,043	7,699	+0,017
	7,685	—	+0,095	—	—
C <sub>5</sub> H	7,347	7,398	+0,051	7,356	+0,009

бонільною групою карбоксильної групи амінокислоти включає лише один з протонів аміногрупи, при цьому гідроксильний протон карбоксильної групи, очевидно, взаємодіє з атомом N3 6-азаCyt (рисунок, в).

Набагато слабшу взаємодію 6-азаCyt з карбоксильною групою амінокислот порівняно з Cyt можна розглядати як свідчення більшої міцності внутрішньомолекулярного Н-зв'язку N4H...N3 та внаслідок цього менш успішної конкуренції за зв'язування з 6-азаCyt з боку карбоксильної групи.

Таким чином, в результаті проведеної роботи можна стверджувати, що аномальний нуклеозид 6-азаC, його основа 6-азаCyt та їхні похідні суттєво відрізняються за своєю електронною будовою від канонічних основ та нуклеозидів. Значно більша асиметрія кільця, обумовлена заміною С6 на N6, є

причиною більшої нееквівалентності протонів аміногрупи та зростання величини бар'єра її обертання, що в результаті призводить до розщеплення її сигналу в спектрах ПМР. Останнє збільшується при заміщеннях в першому та п'ятому положеннях кільця та є практично адитивним, крім br<sup>5</sup>-6азаC, де атом бром у п'ятому положенні ініціює сильний внутрішньомолекулярний Н-зв'язок із сусіднім аміним атомом водню.

Аналіз характеру зміни хімізсувів компонент дублетного сигналу аміногрупи при метилзаміщенні в п'ятому положенні дозволяє зробити висновок про те, що один з амінопротонів утворює внутрішньомолекулярний зв'язок з атомом N3.

Про значну відмінність у будові 6-азаCyt в порівнянні з Cyt свідчить також зворотна специфічність щодо взаємодії з карбоксильною групою

амінокислоти та карбоксилат-іоном у безводному DMSO.

Дані ІЧ спектроскопії вказують на існування досліджених похідних 6-азацитозинового ряду з незаміщеною аміногрупою у keto-амінній формі.

Зазначені особливості будови 6-азапохідних цитозину та цитидину створюють фізико-хімічний фундамент для розуміння механізмів терапевтичної дії через втручання у процеси синтезу ДНК, поліпептидів та білків.

Плідність продемонстрованого підходу до вивчення лікувальної природи нуклеозиду 6-азаС та його похідних спонукає нас продовжити дослідження, зокрема квантовохімічними методами, їхніх фізико-хімічних властивостей одночасно із спрямованим синтезом ефективніших препаратів.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки з боку Міністерства України у справах науки і технології (договір № 2/1123-97).

С. А. Самойленко, И. В. Алексеева, Л. И. Пальчиковская, И. В. Кондратюк, А. В. Степанюгин, А. С. Шаламай, Д. Н. Говорун

Структурные особенности 6-азацитидина и его производных: данные ПМР и ИК спектроскопии

Резюме

Методами ИК спектроскопии и ПМР исследованы 6-азаCyt, 6-азаC и ряд их производных и родственных соединений. Дублетное расщепление сигнала аминной группы 6-азаCyt в спектрах ПМР, отсутствующее в спектрах канонического основания Cyt, нуклеозидов C и dC при идентичных условиях эксперимента, свидетельствует о большей неэквивалентности аминных протонов, обусловленной большей асимметрией электронного строения, которое увеличивается при замещении кольца по положениям 1 и 5, и повышенным барьером вращения аминной группы. Низкочастотная компонента дублета малочувствительна к 5-метилзамещению, что, очевидно, связано с вовлечением одного из аминных протонов во внутримолекулярную H-связь с атомом N3. Показана обратная (по сравнению с Cyt) специфичность взаимодействия 6-азаCyt с карбоксильной группой аминокислот и карбоксилат-ионом в безводном DMSO. Данные ИК спектроскопии подтверждают существование исследованных соединений с незамещенной аминной группой в DMSO и твердой фазе в форме keto-аминных таутомеров.

S. P. Samiilenko, I. V. Alexeeva, L. H. Palchykiv's'ka, I. V. Kondratyuk, A. V. Stepanyugin, A. S. Shalamay, D. M. Hovorun

Structural features of 6-azacytidine and its derivatives: data of NMR and IR spectroscopies

Summary

Study of 6-azaCyt, 6-azaC, a number of their derivatives and related compounds was conducted by IR and NMR spectroscopies. Doublet splitting of amino group signal in NMR spectra of 6-azaCyt (unlike the cases of canonical base Cyt, nucleosides C and dC under the same experimental conditions) indicates nonequivalency of amino protons caused by greater asymmetry of electron structure which increases on ring substitutions at the 1 and 5 positions and

increased barrier of amino group rotation. The low field component of the doublet is only responsive to the 5-methyl substitution, as probably related to the involvement one of amino protons into an intramolecular H-bond with the N3 atom. Inverse (as compared to Cyt) specificity of interactions of 6-azaCyt with the amino acid carboxylic group and carboxylate-ion in anhydrous DMSO has been shown. IR spectroscopy data support the conclusion that investigated compounds with nonsubstituted amino group exist as keto-amino tautomers in DMSO and solid state.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Skoda J. Mechanism of action and application of azapyrimidines // Progr. Nucl. Acid Res.—1963.—2.—P. 197.
- Чернецкий В. П., Алексеева И. В. Аномальные нуклеозиды. VII. Синтез 6-азацитидина и его производных // Химия гетероцикл. соединений.—1967.—№ 6.—С. 1109—1113.
- Шаламай А. С., Огняник С. С., Алексеева И. В., Гончаренко В. С. Способ одержання 6-азацитидину // Пат. України UA 1785.29.10.93. // БИ.—№ 3, 25.10.94.
- Петруша Н. А. Противоопухолевые свойства некоторых аномальных нуклеозидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1969.—15 с.
- Бектемиров Т. А., Липицкая Г. Л., Чернецкий В. П., Галегов Г. А. Ингибирующее действие 6-азацитидина на репродукцию вируса осповакцины в культуре ткани // Вопр. мед. химии.—1974.—20, № 1.—С. 50—51.
- Галушко С. В., Булкина З. П., Петруша Н. А., Шишкіна И. П. Исследование фармакокинетики 6-азацитидина // Хим. фарм. журн.—1986.—20, № 1.—С. 1302—1305.
- Петруша Н. А. Некоторые токсико-фармакологические свойства 6-азацитидина // Фармакология и токсикология.—1987.—№ 2.—С. 75—76.
- Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Бутенко С. И. и др. Влияние 6-азацитидина на экспрессию аденовирусного генома // Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций.—Рига: Зинатне, 1991.—С. 81—93.
- Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Шаламай А. С. и др. Антиаденовирующее и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 4.—С. 75—85.
- Скрипаль І. Г., Онщенко А. М., Токовенко І. П. та ін. Обґрунтування можливості застосування моноцукрів і 6-азацитидину для елімінації з уrogenітального тракту людини молікутів, які асоціюють з ВІЛ/СНІДом // Мікробіол. журн.—1996.—58, № 5.—С. 80—85.
- Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Шаламай А. С. и др. N4-аминокислотные производные 6-азацитидина: синтез и биологическая активность // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 4.—С. 285—290.
- Gut J., Jonas J., Pitha J. Nucleic acid components and their analogues. XLIX. Tautomeric structure of 6-azacytosine and its derivatives // Collect. Czechoslovak. Chem. Commun.—1964.—29.—P. 1394—1400.
- Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Огняник С. С., Шаламай А. С. Синтез и биологическая активность N1-замещенных 6-азацитозинов // Хим.-фарм. журн.—1994.—28, № 4.—С. 16—18.
- Шаламай А. С., Дашевская Т. А. Способ получения 2'-дезоксид-6-азацитидина // Укр. хим. журн.—1992.—№ 7.—С. 583—585.
- Алексеева И. В., Сидоров Г. В., Шаламай А. С. и др. Синтез тритиймеченных 6-азауридина и 6-азацитидина // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 52—58.
- Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломісць І. М. та ін. Взаємодія метил- та глікозилпохідних піриміди-

- нових нуклеотидних основ з карбоксильною групою амінокислот // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 45—51.
17. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Коломієць І. М., Кондратюк І. В. Взаємодія нуклеотидних основ з карбоксильною групою амінокислот в ДМСО: модель точкових білково-нуклеїнових комплексів // Доповіді АН УРСР. Сер. Б.—1988.—№ 8.—С. 68—71.
  18. Желтовський М. В., Самійленко С. П., Губайдуллин М. І., Кондратюк І. В. Коливальний спектр і структура комплексу цитозину з N-формілглїцином у твердій фазі // Там же.—№ 5.—С. 72—75.
  19. Кондратюк І. В., Коломієць І. Н., Самійленко С. А., Желтовський М. В. Изучение комплексов цитозина с карбоксильной группой аминокислот методом спектроскопии ЯМР // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 6.—С. 21.
  20. Говорун Д. Н., Мищук Я. Р., Желтовський М. В. Низкочастотные фоновые спектры комбинационного рассеяния света компонентов нуклеиновых кислот: пиримидиновые основания // Там же.—1990.—6, № 3.—С. 31—39.
  21. Говорун Д. Н., Мищук Я. Р., Желтовський М. В. Низкочастотные спектры КР некоторых метилазамещенных компонентов нуклеиновых кислот: пиримидиновые основания // Там же.—1991.—7, № 1.—С. 55—62.
  22. Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Нееквівалентність аміних атомів водню в канонічних нуклеотидних основах // Доповіді НАН України.—1995.—№ 8.—С. 130—132.
  23. Говорун Д. М., Кондратюк І. В. Анізотропія обертальної рухливості аміногрупи в канонічних нуклеотидних основах // Там же.—1996.—№ 10.—С. 151—154.
  24. Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Внутрішньомолекулярні кооперативні водневі зв'язки в нуклеотидних основах // Там же.—№ 8.—С. 141—144.
  25. *The chemistry of the amino group* / Ed. S. Patai.—London; New York; Sydney: Intersc. Publ., 1968.—253 p.
  26. Orville-Thomas W. J., Parsons A. E., Ogden C. P. NH<sub>2</sub>-stretching frequencies in primary amines // J. Amer. Chem. Soc.—1958.—N 3.—P. 1047—1049.
  27. Krueger P. J. The vibrational mechanisms of the fundamental NH<sub>2</sub> stretching vibrations in anilines // Can. J. Chem.—1962.—40, N 12.—P. 2300—2316.
  28. Иогансен А. В. Резонанс Ферми и структура полос N(A-H) в комплексах с водородной связью // Оптика и спектроскопия.—Ленинград: Наука, 1967.—С. 228—231.
  29. Жукова Е. Л., Шманько И. И. Влияние водородной связи на колебания группы NH<sub>2</sub>. I. Частоты валентных колебаний // Оптика и спектроскопия.—1968.—25, № 4.—С. 500—505.
  30. Жукова Е. Л., Шманько И. И. Влияние водородной связи на колебания группы NH<sub>2</sub>. II. Интенсивности полос валентных колебаний // Там же.—1969.—26, № 4.—С. 532.
  31. Жукова Е. Л., Шманько И. И. Влияние водородной связи на колебания группы NH<sub>2</sub>. III. Внутренние деформационные колебания // Там же.—1972.—32, № 3.—С. 514.
  32. Иогансен А. В., Рассадин Б. В., Бочкарева М. Н. и др. Водородные связи и Ферми-резонанс в инфракрасных спектрах (3-аминопропил)дибутилборана с основаниями // Журн. прикл. спектроскопии.—1971.—15, № 6.—С. 1046—1054.
  33. Wolf H., Mathias D. Hydrogen bonding and Fermi resonance of aniline // J. Phys. Chem.—1973.—77, N 17.—P. 2081.
  34. Wolf H., Mathias D. Hydrogen bonding and Fermi resonance of mixed adducts of aniline. The behaviour of NH<sub>4</sub> deformation vibration // Ibid.—1980.—84, N 18.—P. 2335—2337.
  35. Денисов Г. С., Кузина Л. А., Смолянський А. Л. Инфракрасные спектры и энергетика комплексов нонафторгетретиламина с акценторами протона // Журн. прикл. спектроскопии.—1988.—48, № 3.—С. 409—420.
  36. Денисов Г. С., Кузина Л. А., Смолянський А. Л., Фурт Г. Г. Энергетическая неаддитивность водородных связей фторзамещенных ароматических аминов с акценторами протона // Там же.—1990.—52, № 3.—С. 476—557.
  37. Говорун Д. М., Данчук В. Д., Мищук Я. Р. та ін. Дзеркальносиметричні конформаційні стани канонічних нуклеотидних основ // Доповіді АН України.—1992.—№ 2.—С. 66—69.
  38. Говорун Д. М., Данчук В. Д., Мищук Я. Р. та ін. Про неплосцильність та дипольну нестійкість канонічних нуклеотидних основ, метильованих по глікозидному азоту // Там же.—1995.—№ 6.—С. 117—119.
  39. Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В. Про квантовохімічну природу стереохімічної нежорсткості канонічних нуклеотидних основ // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 5—12.
  40. Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В. Топологічні властивості гіперповерхні потенціальної енергії канонічних нуклеотидних основ // Там же.—С. 13—17.
  41. Говорун Д. М. Структурно-динамічна модель спонтанних напіврозкритих станів ДНК // Там же.—1997.—13, № 1.—С. 39—45.
  42. Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В. Динамічна стереоізомерія Уотсон-Криківських пар нуклеотидних основ // Доповіді НАН України.—1995.—№ 11.—С. 117—119.
  43. Kwiatkowski J. S., Leszczyński J. Molecular structure and vibrational IR spectra of cytosine and its thio and seleno analogues by density functional theory and conventional *ab initio* calculations // J. Phys. Chem.—1996.—100, № 3.—P. 941—953.
  44. Lapinski L., Nowak M. J., Fulara J. et al. Matrix isolation and *ab initio* theoretical studies of the IR spectrum of 5-methylcytosine // Ibid.—1990.—94, N 17.—P. 6555—6564.
  45. Иогансен А. В. Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи // Водородная связь.—М.: Наука, 1981.—С. 112—155.
  46. Говорун Д. М., Кондратюк І. В. Газофазні кислотнo-лужні властивості канонічних нуклеотидних основ // Доповіді НАН України.—1998.—№ 1.—С. 207—212.
  47. Говорун Д. М., Мищук Я. Р. Енергетика міжмолекулярних водневих зв'язків у кристалах та співкристалізатах основ ДНК: дослідження методом спектральної калориметрії // Укр. фіз. журн.—1997.—42, № 8.—С. 933—938.
  48. Samijlenko S. P., Kolomiets' I. M., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. Model considerations on physico-chemical nature of protein-nucleic acid contacts through amino acid carboxylic groups: spectroscopic data // Biopolymers and Cell.—1998.—14, N 1.—(In press).
  49. Кондратюк І. В. Дослідження фізико-хімічної природи елементарних процесів молекулярного розпізнавання методами ЯМР, коливальної спектроскопії та комп'ютерного моделювання: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Київ: ІМБіГ НАН України, 1996.—19 с.
  50. Samijlenko S. P., Kolomiets' I. M., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. Physico-chemical features of complexes modelling recognition of nucleic acid components by amino acids' carboxylic group: data of spectroscopic experiments // Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends, Annex.—Madrid: Univ. press, 1997.—P. 69—70.