



УДК 547.854.4'823.057+547.857.7'823.057 : 577.164.13

ПИРИДОКСИЛ-5'-ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

*Барнейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И.**Научно-производственное объединение «Витамины», Москва*

Осуществлен синтез аналогов нуклеозидов, содержащих вместо остатка углевода фрагмент молекулы витамина В₆ (пиридоксина). Взаимодействием 3,4'-О-изопропилиденпиридоксил-5'-хлорида с натриевыми солями урацила, аденина или бензимидазола с последующим удалением защитных групп получены 1-(пиридоксил-5'')урацил, 1,3-бис(пиридоксил-5'')урацил, 9-(пиридоксил-5'')аденин и 1-(пиридоксил-5'')бензимидазол. Аналогичное алкилирование 4-О-метилурацила с последующим аминированием и кислотным гидролизом привело к 1-(пиридоксил-5'')цитозину.

Среди негликозидных аналогов нуклеозидов найдены вещества, обладающие высокой биологической активностью [1—4]. Пиридоксильные производные нуклеиновых оснований [5, 6] — новый класс негликозидных аналогов нуклеозидов, потенциальных ингибиторов основных ферментов, участвующих в метаболизме нуклеозидов и нуклеотидов. Настоящее сообщение посвящено синтезу и изучению физико-химических свойств производных 1-(пиридоксил-5'')урацила, 9-(пиридоксил-5'')аденина и 1-(пиридоксил-5'')бензимидазола.

Нами было показано [5], что алкилирование нуклеиновых оснований пиридоксином приводит исключительно к С4'-производным пиридоксина. Поэтому для получения С5'-производных необходимо было избрать другой метод синтеза. Для осуществления этой задачи в положении 5' пиридоксина необходимо иметь хорошую уходящую группу. В этом смысле наиболее доступным соединением является 3,4'-О-изопропилиденпиридоксил-5'-хлорид (VII).

Обработкой гидридом натрия в безводном DMF или 1 н. метилатом натрия в метаноле нуклеиновых оснований и бензимидазола получали их исходные натриевые соли. Конденсацию хлорида (VII) и натриевой соли нуклеинового основания или бензимидазола проводили в безводном DMF при 20° С. При использовании в качестве алкилирующего агента 5'-дезоксипиридоксил-5'-хлорида нами отмечено образование продуктов его поликонденсации, что сильно затрудняло выделение и снижало выход целевых веществ.

Обычно алкилирование урацила приводит к смеси N- и O-производных. Их соотношение зависит, как правило, от условий реакции. Для получения заведомого образца 1-(пиридоксил-5'')урацила (II) мы алкилировали натриевую соль 4-О-метилурацила хлоридом (VII). Образующийся при этом ацетонид (VI) подвергали гидролизу 10% HCl при 100° С. При аминировании соединения (VI) насыщенным аммиаком в метаноле при 150° С получали 1-(3',4''-О-изопропилиденпиридоксил-5'')цитозин (V), который после кислотного гидролиза давал 1-(пиридоксил-5'')цитозин (I).

При алкилировании натриевой соли урацила пиридоксилхлоридом (VII) в DMF, по данным ТСХ, образуется смесь двух веществ, одно из которых после удаления защитной группы было идентично соединению (II); другому, образующемуся в преобладающем количестве, на основании данных физико-химического анализа была приписана структура 1,3-бис(пиридоксил-5'')урацила (IX).

Важно подчеркнуть, что длительная обработка (18—20 ч) 10% соляной кислотой при 100° С не приводила к гидролизу С5''—N1-связи.

УФ-спектры синтезированных соединений

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}(\text{e} \cdot 10^{-3})$	
	0,1 н. HCl	0,1 н. NaOH
(I)	287 (16,8)	274 (9,8), 243 (11,5) плечо, 310 (8,6)
(II)	268 (9,5), 288 (10,7)	263 (9,1), 248 (10,3), 309 (8,2)
(III)	268 (9,4), 275 (10,7), 290 (9,1)	263 (6,5), 272 (5,8), 275 (5,8), 247 (14,1), 309 (8,6)
(IX)	269 (17,7)	269 (6,1), 245 (10,2), 308 (8,9)
(XII)	258 (15,3), 288 (11,8)	256 (19,4), 309 (9,4)
Пиридоксин *	290 (8,4)	245 (6,5), 310 (7,3)

* Данные работы [9].

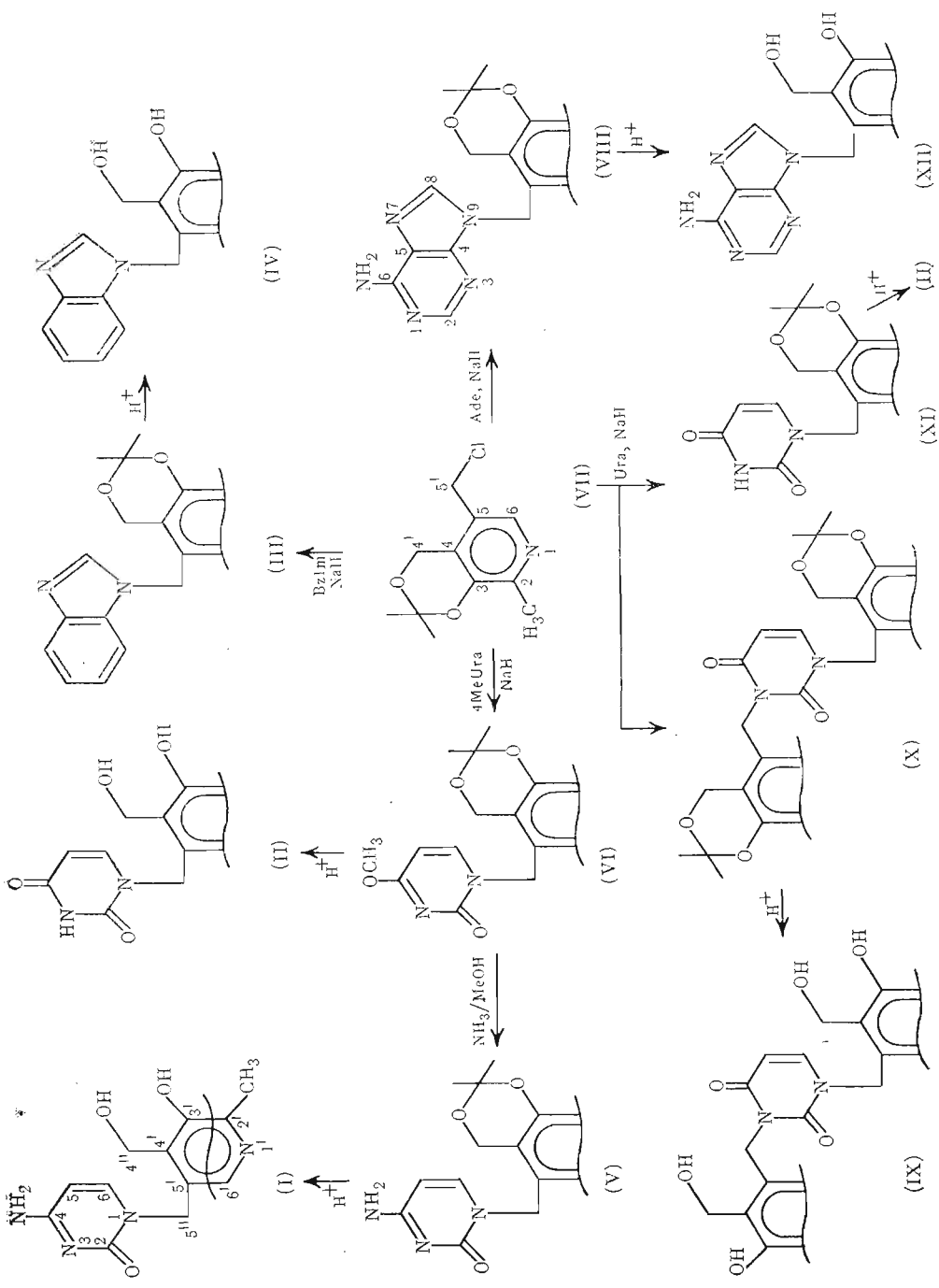
Алкилирование аденина и бензимидазола проводили в условиях, описанных для урацила. Как правило, при алкилировании натриевых солей аденина в DMF образуется смесь соответствующих 3- и 9-изомеров с преобладанием последнего [7]. В нашем случае основной продукт был выделен в индивидуальном состоянии многократной перекристаллизацией из этанола и было доказано (см. далее), что он представляет собой 9-(3',4''-О-изопропилиденпиридоксил-5'') аденин (VIII).

Строение полученных соединений подтверждено с помощью УФ-, ПМР-и масс-спектров. Известно, что в УФ-спектре 4-метилурацила при pH 1 имеется максимум поглощения при 268 нм, а при pH 14 — 265 нм [8]. Катион пиридоксина при pH 4 имеет максимум поглощения в области 290 нм, а в щелочной среде появляются два максимума, отвечающие аниону пиридоксина, — 245 и 310 нм [9].

В УФ-спектрах синтезированных соединений имеются полосы поглощения, характерные как для пиридоксидиновой, так и для нуклеиновой части молекулы (табл. 1). В случае производных (II) и (IV) эти полосы не перекрываются, и поэтому отнесение однозначно. В УФ-спектрах соединений (I) и (IX), снятых в кислой среде, имеется явное перекрывание полос, однако в щелочной среде этого не наблюдается, и отнесение также возможно. Отсутствие каких-либо новых полос поглощения позволяет заключить, что, по всей вероятности, взаимодействие между π -электронными системами гетероциклов минимально, а суммарный спектр является суперпозицией спектров пиридоксина и соответствующего нуклеинового основания или бензимидазола. Как видно из табл. 1, соединение (II) ведет себя аналогично 4-метилурацилу: отсутствие bathochromic сдвига максимума поглощения, соответствующего урацильной части молекулы, при переходе от pH 1 к pH 14 свидетельствует о том, что соединение (II) является N1-изомером (3-метилурацил при pH 1 имеет $\lambda_{\text{макс}}$ 259 нм, а при pH 14—283 нм [8]). Спектральные характеристики соединения (I) в 0,1 н. NaOH близки таковым для производного (II). Соединение (IX), как и 4,3-диметилурацил [8], имеет независимый от pH максимум поглощения урацильной части молекулы при 266 нм. Производные (XII) обладают максимумом поглощения адениновой части молекулы при 258 нм (0,1 н. HCl) и 256 нм (0,1 н. NaOH), что вполне согласуется с поведением 9-метиладенина в аналогичных условиях [8] и позволяет считать рассматриваемое соединение N9-изомером.

Важные сведения о структуре синтезированных соединений были получены при изучении спектров ПМР (табл. 2 и 3), в которых имеются сигналы протонов, соответствующие как пиридоксидиновой части молекулы, так и остатку нуклеинового основания или бензимидазола.

Наибольшие трудности вызывало отнесение сигналов 4''-CH₂- и 5''-CH₂-групп в синтезированных соединениях. Эта задача решалась с применением техники двойного резонанса с использованием пиридоксина в качестве модельного соединения. При насыщении системы спинов, соответствующей сигналу протона 6-Н в спектре пиридоксина, мы наблюдали незна-



Спектры ПМР пиридоксил-5'-пиримидинов *

Соединение	Химические сдвиги, δ , м. д. (J , Гц)					
	2'-СН ₃ с	4''-СН ₂ с	5'-СН ₂ с	6'-Н ус	5-Н д	6-Н д
(V)	2,31	4,81	4,98	7,88	7,68 (7,5)	5,81 (7,5)
(VI)	2,38	4,70	4,81	7,82	7,28 (8,0)	5,80 (8,0)
(X)	2,26 и 2,28	4,86	4,96	7,73 и 7,78	7,73 (8,0)	5,76 (8,0)
(I)	2,66	5,00	5,25	8,07 (7,6)	7,92 (7,6)	6,24 (7,6)
(II)	2,63	4,996	5,17	7,96	7,70 (8,0)	5,90 (8,0)
(IX)	2,58	4,90 и 5,01	5,18 и 5,24	7,81 и 7,83	7,75 (7,8)	6,03 (7,8)

* Спектры соединений (V), (VI) и (X) записаны в DMSO-*d*₆, соединений (I), (II) и (IX) — в D₂O. В спектрах производных (V), (VI), (X) сигнал протонов изопропилиденной группы находится при 1,53; 1,50 и 1,48 м. д. соответственно, а метоксильной группы соединения (VI) — при 3,90 м. д.

чительное сужение сигнала 4'-СН₂ и расщепление сигнала 5'-СН₂ до дублета, что свидетельствует, вероятно, о наличии слабого взаимодействия между 5'- и 4'-СН₂. Подавление спин-спинового взаимодействия с 5'-СН₂ приводит к значительному сужению сигнала 6-Н. При насыщении системы спинов, отвечающей 4'-СН₂, сигнал протона 6-Н проявляется в виде искаженного триплета с константой спин-спинового взаимодействия 0,5 Гц. На основании этих данных можно утверждать, что уширенный сигнал, отвечающий 6-Н в спектре ПМР пиридоксина, представляет собой мультиплет, отражающий спин-спиновое взаимодействие с 5'-СН₂ и сверхдальнее взаимодействие с 4'-СН₂. Наличие взаимодействия между 5'-СН₂ и 6-Н и связанного с ним значительного уширения сигнала последнего мы положили в основу отнесения сигналов 5''-СН₂ и 4''-СН₂ в исследуемых в настоящей работе соединениях.

В спектре ПМР соединения (II) сигнал при 4,99 м. д. отнесен нами к 4''-СН₂, а сигнал при 5,17 м. д. — к 5''-СН₂. При насыщении системы спинов, дающей сигнал при 5,17 м. д., происходит сужение сигнала 6'-Н (полуширина до подавления 1,8 Гц, после — 0,6 Гц). При насыщении системы спинов, соответствующей сигналу при 4,99 м. д., мы не наблюдали заметного изменения полуширины сигнала 6'-Н. Как в пиридоксине и соединении (II), так и в случае производного (XII) сигнал 6'-Н значительно уширен. Сигнал при 5,04 м. д. отнесен к 4''-СН₂, а при 5,66 м. д. — к 5''-СН₂. Следует подчеркнуть, что характерным признаком сигнала 5''-СН₂ во всех соединениях, рассматриваемых в данном сообщении, является значительно бо́льшая полуширина линии по сравнению с сигналом 4''-СН₂.

Таблица 3

Спектры ПМР пиридоксил-5'-аденина и -бензимидазола *

Соединение	Химические сдвиги, δ , м. д.					
	2'-СН ₃ с	4''-СН ₂ с	5''-СН ₂ с	6'-Н ус	8-Н с	2-Н с
(III)	2,39	4,41	5,15	7,75	7,15-7,28 ^{2*}	7,95
(VIII)	2,30	5,04	5,29	7,88	8,11	8,22
(IV)	2,65	4,98	5,98	7,89	7,66-7,71 ^{2*}	9,22
(XII)	2,67	5,04	5,66	7,96	8,36	8,41

* Спектры соединений (III), (VIII) записаны в DMSO-*d*₆, соединений (IV), (XII) — в D₂O. В спектрах производных (III) и (VIII) сигнал протонов изопропилиденной группы находится при 1,42 м. д.

^{2*} Мультиплет протонов бензольного кольца.

Масс-спектры соединений (II), (IV), (XII)

Соединение	m/z	Относительная интенсивность, %	Фрагмент
(II)	263	16,2	M^+
	245	41,9	$M^+ - H_2O$
	152	25,5	$M^+ - Ura$
	151	100,0	$M^+ - Ura - H$
	138	25,5	$M^+ - Ura - CII_2$
	125	4,6	$Ura - CH_2^+$
	112	32,2	Ura^+
	82	29,3	$Ura^+ - HNCO$
	69	15,6	$Ura - CII_2^+ - HNCO$
	(IV)	269	100,0
251		37,5	$M^+ - H_2O$
151		17,8	$M^+ - BzIm$
149		62,7	$BzIm - H$
118		9,2	$BzIm^+$
(XII)	286	6,1	M^+
	268	3,5	$M^+ - H_2O$
	151	15,1	$M^+ - Ade$
	135	15,1	Ade^+

Отнесение сигналов 2- и 8-Н в соединении (XII) осуществляли, используя обмен протона 8-Н на дейтерий при нагревании в D_2O , что приводило к значительному уменьшению интенсивности сигнала 8-Н при неизменной интенсивности сигнала 2-Н. Таким образом, сигнал при 8,41 м.д. отнесен нами к 2-Н, а сигнал при 8,36 м.д. — к 8-Н.

Для подтверждения структуры соединений (II) и (XII) мы провели эксперименты по наблюдению ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). В соединении (II) максимальную величину ЯЭО при насыщении $5''-CH_2$ мы наблюдали между $5''-CH_2$ и 6'-Н. Эта величина составила $f_6(5'')=0,45$. На основании этого факта можно считать, что рассматриваемые группы атомов обладают наибольшей пространственной близостью, что возможно только в N1-изомере. В соединении (XII) максимальный ЯЭО при насыщении $5''-CH_2$ наблюдали между $5''-CH_2$ и 8-Н. В этом случае величина ЯЭО составила $f_8(5'')=0,4$. Таким образом, можно заключить, что аналог (XII) представляет собой N9-изомер. Дополнительно к этому, согласно [10], разность химических сдвигов $\Delta\delta_{2,8}$ у N3-алкиладенинов лежит в пределах 0,4–0,8 м.д., а у N9-производных — 0,05–0,15 м.д. Для производного (XII) $\Delta\delta_{2,8}$ составила 0,05 м.д., что хорошо согласуется с приведенной структурой.

В масс-спектрах всех синтезированных соединений присутствуют пики соответствующих молекулярных ионов и пики ионов, отвечающих остаткам пиридоксина и нуклеинового основания или безимидазола (табл. 4 и 5). Дальнейшая фрагментация остатков пиридоксина [11, 12] и нуклеиновых оснований [13] совпадает с литературными данными. Фрагментация соединения (II) находится в полном соответствии со структурой 1-алкилурацила [13].

Таким образом, разработанные нами методики позволяют получать новый тип пептидоксиновых аналогов нуклеозидов на основе пиридоксина.

Экспериментальная часть

Температуры плавления, определенные на блоке Кофлера, не исправлены. УФ-спектры измеряли на приборе Beckman 26 (США). Масс-спектры записаны на приборе Jeol JMS-01-SG-2 (Япония), спектры ЯМР — на приборах Bruker WP-80 (ФРГ) и Varian XL-100-15 (США). ЯЭО наблюдали на приборе XL-100-15 при 37°С. Образцы после предварительной обработки с Chelex-100 в D_2O лиофилизировали и растворяли в 0,6 мл D_2O (99,8%). Значения ЯЭО вычисляли по формуле

$$(h-h_0)/h_0,$$

Характеристики синтезированных соединений

Соединение	R _f (система ра- створителей)	Т. пл., °С	M+	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
				C	H	N		C	H	N
(I)	0,19(B)	>300	262	40,84	5,12	15,86	C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₃ ·2HCl·H ₂ O	40,80	5,21	15,91
(II)	0,13(A) 0,14(B)	227-229	263	47,82	4,77	13,83	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ ·HCl	48,09	4,71	14,09
(III)	0,68(A)	56	309	69,75	6,18	13,62	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂	69,88	6,19	13,58
(IV)	0,20(A)	141-143	269	52,48	4,92	12,35	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂ ·2HCl	52,64	5,00	12,28
(V)	0,37(A)	—	302	59,60	6,05	18,50	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₃	59,41	5,98	18,48
(VI)	0,44(B)	89-91	317	60,63	6,08	13,31	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄	60,55	6,04	13,24
(VIII)	0,12(Г)	206-209	326	58,73	5,62	25,75	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O ₂	58,88	5,56	25,75
(IX)	0,12(B)	—	414	49,52	4,85	11,71	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ ·2HCl	49,29	4,96	11,50
(X)	0,55(Г)	97-98	494	62,92	5,95	11,20	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₆	63,14	6,11	11,33
(XI)	0,47(Г)	93-94	303	59,53	5,67	14,01	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₄	59,39	5,65	13,86
(XII)	0,11(A) 0,29(B)	246-247	286	43,35	4,52	23,37	C ₁₃ H ₁₄ N ₆ O ₂ ·2HCl	43,46	4,49	23,48

где h — высота пика при насыщении выбранной системы спинов, h_0 — высота того же пика без насыщения. Обмен на дейтерий осуществляли нагреванием образца при 70°С в течение 16 ч (80% обмена). Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно внутренних стандартов: тетраметилсилаца или натриевой соли 3-(триметилсилил) тетрадейтеропропионовой кислоты (сокращения: с — синглет, ус — уширенный синглет, д — дублет, м — мультиплет). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах растворителей: ацетон — диоксан — 25% аммиак, 9:9:2 (А), хлороформ — этанол, 10:1 (Б), изоамиловый спирт — ацетон — вода — диэтиламин, 24:18:6:8 (В), хлороформ — этанол, 20:3 (Г). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L40/100 мкм (Chemapol, ЧССР), элюируя системами хлороформ — этанол, 50:1 (Д), 30:1 (Е), 40:1 (Ж).

3,4'-О-Изопропиллиденпиридоксил-5'-хлорид получали по методу [14] в виде хлоргидрата. Для перевода в основание хлоргидрат суспендировали в хлороформе и промывали 3 раза холодным насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и использовали для последующих реакций.

Алкилирование нуклеиновых оснований и бензимидазола. а) К раствору урацила, 4-О-метилурацила, аденина или бензимидазола (7,58 ммоль) в 20–50 мл безводного DMF прибавляли порциями 1,3–1,5 экв. гидрида натрия и перемешивали до окончания выделения водорода. Затем по каплям прибавляли раствор хлорида (VII) (7,58 ммоль) в 5–10 мл хлороформа и перемешивали 4–12 ч при 20°С. Образовавшийся неорганический осадок отфильтровывали и промывали DMF. Объединенные фильтраты упаривали в вакууме при 60–70°С, остаток несколько раз упаривали с этанолом. Соединение (VIII) выделяли кристаллизацией из этанола (выход 55%), соединения (III), (VI) и (X), (XI) — колоночной хроматографией в системе Ж, Д и Е; выход 60, 70, 12 и 56% соответственно. Полученные изопропиллиденные производные гидролизуют 10% HCl при 100°С в течение 15 мин. Полученный раствор упаривали досуха и несколько раз упаривали с водой и спиртом. Остаток сушили в вакууме над P₂O₅ при 60–80°С.

б) Нуклеиновые основания или бензимидазол растворяли в 1 н. растворе метилата натрия в метаноле, выдерживали 5–10 мин при 20°С и упаривали досуха. Остаток растворяли в безводном DMF и подвергали взаимодействию с хлоридом (VII), как описано в способе а.

1-(Пиридоксил-5')цитозин (I). Раствор 1 г соединения (VI) в 15 мл метанола, насыщенного при 0°С аммиаком, нагревали 6 ч в автоклаве при 150°С. После охлаждения реакционной смеси осадок отфильтровывали, а маточный раствор упаривали до начала кристаллизации. Выпавший осадок отделяли, соединяли с предыдущим и кристаллизовали из водного ацетона. Получали 0,75 г (80%) 1-(3',4''-О-изопропиллиденпиридоксил-5'') цитозина (V). После удаления защитной группы обычным способом и осаждения ацетатом получали 95% соединения (I) в виде хлоргидрата.

1-(Пиридоксил-5'')урацил (II). Растворяли 2 г (6,3 ммоль) соединения (VI) в 10 мл 10% HCl и нагревали 20 мин при 100°С. Раствор охлаждали, обрабатывали активированным углем, фильтровали и упаривали досуха. Остаток несколько раз упаривали с водой и этанолом и высушивали в вакууме над P₂O₅ при 60–80°С. Получали 1,58 г (95%) соединения (II) в виде хлоргидрата.

Авторы выражают глубокую благодарность И. Д. Бобрускину за измерение и обсуждение спектров ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крицын А. М., Флорентьев В. Л. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 149–171.
2. De Clercq E., Torrecne P. F. J. Carbohydr. Nucleosides, Nucleotides, 1978, v. 5, № 3, p. 187–224.
3. De Clercq E. Trends in Pharm. Sci., 1982, № 12, p. 492–495.
4. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена. Итоги науки и техники. ВИНТИ. «Биоорганическая химия», 1983, т. 1.

5. Карпейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И., Михайлов С. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1047-1052.
6. Карпейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И., Михайлов С. Н. В кн.: Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Тез. докл. Рига, 1982, с. 131.
7. Sueita T., Yamanchi K., Kinoshita M., Imoto M. Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, v. 45, № 3, p. 926-928.
8. Albert A. In: Synthetic procedures in nucleic acid chemistry/Eds Zorbach W. W., Tipson R. S. Wiley - Interscience, 1973, v. 2, p. 47-123.
9. Johnson R. J., Metzler D. E. In: Methods in Enzymology/Eds McCormick D. B., Wright L. D. 1970, v. 18A, p. 433-471.
10. Beasley E. A., Rasmussen M. Aust. J. Chem., 1981, v. 34, p. 1107-1116.
11. De Yongh D. C., Perricone S. C., Gay M. L. Org. Mass Spectr., 1968, v. 1, p. 151-166.
12. De Yongh D. C., Perricone S. C., Korytnyk W. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 1233-1237.
13. McCloskey J. A. In: Basic principles in nucleic acid chemistry/Ed. Ts'o P. O. P. v. 2, Acad. Press, 1974, p. 209-309.
14. А. с. 722908 (СССР). Способ получения дисульфида пиридоксина/Скляров Л. Ю. Оубл. в Откр., изобр., пром. образцы, тов. знаки, 1980, № 11, с. 81.

Поступила в редакцию
26.II.1985

PYRIDOXYL-5'-DERIVATIVES OF NUCLEOBASES

KARPEISKY A. M., L'VOVA S. D., GUNAR V. I.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

The synthesis of nucleoside analogues having instead of sugar moiety the vitamin B₆ (pyridoxine) fragment was carried out. The reaction of 3,4'-O-isopropylidene-pyridox-5'-yl-chloride with sodium salts of uracyl, adenine or benzimidazole followed by deblocking afforded 1-(pyridoxyl-5'')uracyl, 1,3-bis(pyridoxyl-5'')uracyl, 9-(pyridoxyl-5'')adenine and 1-(pyridoxyl-5'')benzimidazole, respectively. Alkylation under the same conditions of 4-O-methyluracyl followed by amination and deprotection resulted in 1-(pyridoxyl-5'')cytosine. The structure of all compounds synthesized was elucidated by means of UV-, NMR- and mass-spectroscopy.