



УДК 547.857.7'455.466'131.057

© 1990 г.

СКЛОННОСТЬ К ЦИКЛИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ 8-ЗАМЕЩЕННЫХ 5'-ДЕЗОКСИ-5'-ХЛОРАДЕНОЗИНОВ

Зария Д.Э., Лиелиньш Э.Э., Лидак М.Ю.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

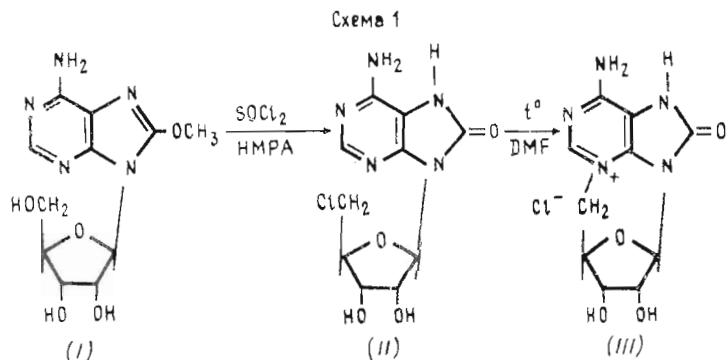
Изучено хлорирование трех 8-R-аденозинов (R = OCH₃, NH₂ и SH) тионилхлоридом в гексаметилфосфортриамиде. Хлорирование 8-метоксиаденозина сопровождается деметилированием; продукт при нагревании в DMF превращался в 8-гидрокси-3,5'-циклоаденозин. 8-Амино- и 8-меркаптоаденозины показали значительную склонность к образованию в условиях хлорирования соответствующих 5',8-ангидроаденозинов. Полученные соединения показали умеренную цитотоксичность *in vitro* на меланоме В16.

Наша предыдущая работа [1] была посвящена синтезу 8-замещенных 5'-дезоксипентозидов. В ней показано, что метод [2] хлорирования рибонуклеозидов тионилхлоридом в гексаметилтриамиде фосфорной кислоты (НМРА) пригоден также для получения ряда 8-замещенных 5'-дезоксипентозидов. Настоящая работа посвящена хлорированию еще трех соединений — 8-метокси-, 8-амино- и 8-меркаптоаденозина.

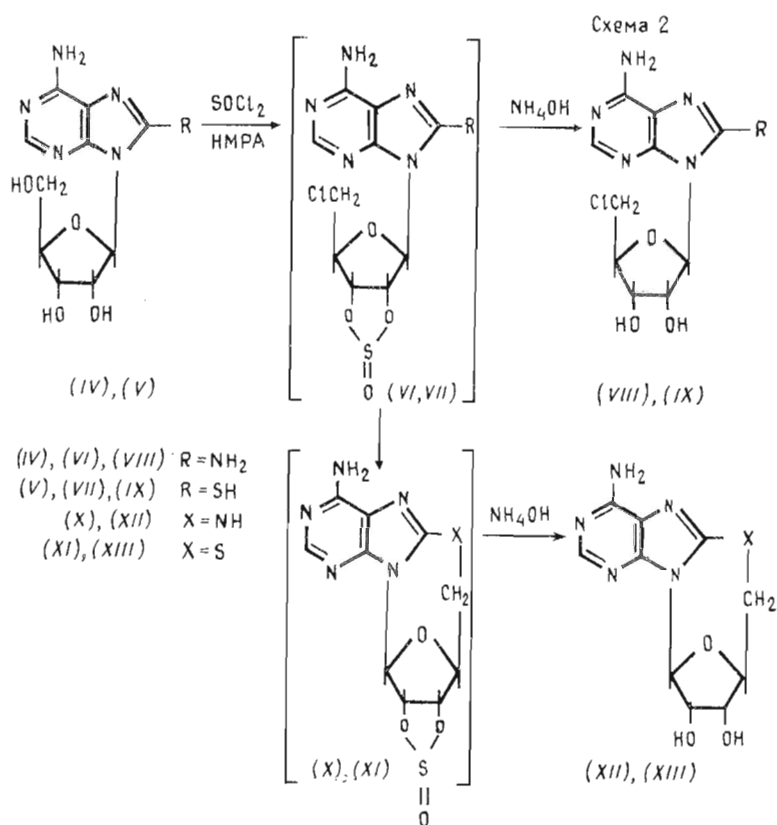
Хлорирование 8-метоксиаденозина тионилхлоридом в НМРА упоминается в работе [3]. При этом был выделен 5'-дезоксипентозид, который использовали в качестве промежуточного соединения для получения 5'-дезоксипентозидов. Наша попытка таким же путем получить 5'-дезоксипентозиды оказалась безуспешной. Анализ полученного продукта показал, что наряду с хлорированием 5'-положения произошло также деметилирование соединения.

Отсутствие метильной группы наглядно показывает спектр ¹H-ЯМР. Кроме того, появившийся в нем широкий синглет при 10,27 м. д. идентичен сигналу в спектре 8-гидроксиаденозина [4] и соответствует NH-протону в положении 7. В ИК-спектре продукта проявляется расщепленная полоса поглощения карбонильной группы (1714 и 1732 см⁻¹), что указывает на существование соединения в кето-форме. На основании этих данных мы приписали продукту структуру (II).

При нагревании соединения (II) в диметилформамиде оно, аналогично 5'-дезоксипентозиду [5], превращалось в соответствующее 3,5'-циклическое соединение (III) (схема 1), структура которого подтверждена спектром ¹H-ЯМР. В ИК-спектре этого соединения также наблюдается поглощение карбонильной группы при 1723 см⁻¹.

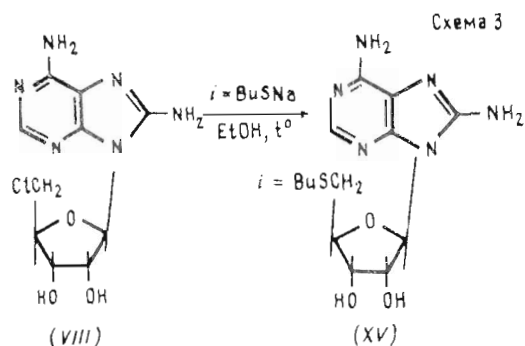


О хлорировании 8-аминоаденозина (IV) и 8-меркаптоаденозина (V) нами предварительно сообщалось ранее [6]. В этих случаях среди продуктов реакции в значительных количествах были обнаружены соответствующие 5',8-ангидроциклы. По данным ВЭЖХ, они составляли около 50% продуктов при хлорировании 8-аминоаденозина и до 62% — при хлорировании 8-меркаптоаденозина. Такие циклы ранее получены другими методами, в основном из 5'-О-тозилных производных, и описаны в литературе [7—9]. Из работы [8], которая посвящена синтезу конформационно закрепленных аналогов нуклеозидов, известно, что для успешного протекания 5',8-циклизации 5'-О-тозилных или 5'-фенилтиопроизводных пуриновых нуклеозидов требуется введение ацетальных защитных групп (пятичленных циклических), закрепляющих O2'- и O3'-атомы в конформации, удобной для циклизации. Вероятно, имеющаяся в промежуточных продуктах хлорирования (VI) и (VII) циклическая сульфитная группа также способствует замыканию 5',8-цикла (схема 2).



Мы искали возможности повлиять на ход реакции. Известно, что при хлорировании тионилхлоридом в НМРА избыток последнего связывает освободившийся в ходе реакции хлористый водород [10], образуя относительно стабильный комплекс [11]. Возможно, это и способствует образованию цикла. В случае хлорирования 8-аминоаденозина нам удалось частично подавить циклизацию, применяя эквимольные количества тионилхлорида и НМРА. Таким образом удалось снизить выход цикла (XII) до 34% (ВЭЖХ), при этом выход второго продукта реакции, которому мы приписали структуру 8-амино-5'-дезоксипентозил-5'-хлораденозина (VIII), достигал 66%. Для анализа смесь продуктов была разделена с помощью ВЭЖХ, однако препаративных методов разделения разработать не удалось. Смесь подвергали воздействию нуклеофильного агента — изобутилат-натрия в этаноле. При этом ангидронуклеозид (XII) оставался неизменным, а хлорпроизводное (VIII) количественно превращалось

в 8-амино-5'-дезоксигуанозин (XV) (схема 3).



Реакционную смесь разделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Структура соединения (XV) сомнений не вызывает и является косвенным доказательством структуры исходного соединения (VIII).

При хлорировании 8-меркаптоаденозина была получена сложная смесь продуктов. ВЭЖХ показала наличие в ней по крайней мере четырех соединений, получающихся с выходом $\geq 10\%$. Основным компонентом смеси оказался 5'-8-ангидро-8-меркаптоаденозин (XIII), выход которого, по данным ВЭЖХ, составлял 44—62%. Благодаря плохой растворимости в этаноле основная его часть была отделена фильтрованием. Полученный таким образом продукт (XIII) содержал примесь, которая, судя по данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, является продуктом 3,5'-циклизации (XIV). Очистку ангидронуклеозида (XIII) от соединения (XIV) осуществляли на силикагеле в системе хлороформ — этанол (4 : 1).

Доказать наличие в реакционной смеси 5'-дезоксигуанозин-8-меркапто-5'-хлораденозина (IX) с помощью изобутилтиолатата натрия не удалось. Кипячение с этим реагентом этанольного фильтрата не привело к ожидаемому изобутилтиопроизводному. Вместо этого наблюдалось увеличение содержания в реакционной смеси циклических продуктов (ВЭЖХ).

Полное разделение продуктов, полученных при хлорировании 8-меркаптоаденозина, осуществить не удалось, однако при повторном разделении на силикагеле выделено галогенсодержащее соединение, которому на основе ^1H - и ^{13}C -ЯМР-, а также УФ-спектров мы приписали структуру 5'-дезоксигуанозин-8-меркапто-5'-хлораденозина (IX).

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР для ациклического, 3,5'-циклического и 8,5'-циклического продуктов весьма характерны, и это позволяет их легко идентифицировать. Так, для соединения (IX) величины $K_{\text{ССВ}}$ и химических сдвигов протонов 5'- CH_2 -группы в спектрах ^1H -ЯМР близки к таковым для остальных 5'-хлорпроизводных (табл. 1 и 2), в то время как для соединения (XIV) наблюдается существенный слабопольный сдвиг сигналов этих протонов. В случае циклического соединения (XIII) 5'- CH_2 -протоны поглощают в наиболее сильных полях. Химические сдвиги ^{13}C для 5'-углеродного атома также позволяют однозначно установить тип структуры: 5'- CH_2Cl поглощает при ~ 45 м. д., 5'- CH_2S — при 34—35 м. д., а 5'- CH_2N^+ — при ~ 59 м. д. (табл. 3).

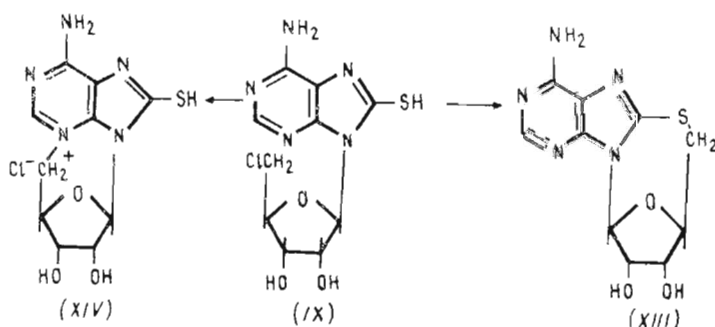
Ограниченное количество соединения (IX) не позволило осуществить широкие исследования, однако проведенные опыты показали его склонность к образованию циклических структур. Судя по изменениям УФ-спектра, при кипячении в 50% этаноле преобладает 5',8-циклизация. Применение ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии дало возможность проследить превращения соединения (IX) в DMSO при нагревании (70° С). При этом одновременно с убыванием интенсивности сигналов, относящихся к соединению (IX), вырастали сигналы, которые соответствуют как 5',8-циклу (XIII), так и 3,5'-циклу (XIV). Приблизительно одинаковый рост концентраций (XIII) и (XIV) свидетельствует, что для соединения (IX) оба

Соединение	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'
(I)	5,72	4,90	4,15	3,91	3,64 3,60
(II)	5,71	4,94	4,30	3,96	3,88 3,74
(IV)	5,88	4,72	4,16	3,99	3,67 3,63
(V)	6,34	5,01	4,22	3,91	3,66 3,51
(VIII)	5,75	5,20	4,32	3,98	3,94 3,80
(IX)	6,49	5,10	4,44	4,01	3,95 3,80
(XII)	6,01	3,96	4,22	4,46	3,30 3,10
(XIII)	6,19	4,68	4,38	4,81	3,19 3,11
(III)	5,81	4,01	4,39	4,60	4,92 4,59
(XIV)	6,31	4,01	4,33	4,66	4,96 4,68
(XV)	5,70	5,15	4,25	3,91	2,88 2,77

* Широкий синглет при 5,4 м. д.

пути циклизации в этих условиях равновероятны (схема 4).

Схема 4



Показана также возможность образования 5',8-ангидроцикла без наличия 2',3'-циклической защиты.

Интересно, что по сравнению с 8-незамещенным аналогом 8-замещенные 3,5'-циклоаденозины (III) и (XIV) более устойчивы в щелочной среде.

Соединения (II), (XII), (XIII) и (XV) проверены на цитотоксичность *in vitro* на меланоме В16. Они входят в группу соединений с умеренной активностью с ЭЦК₅₀ * 5,6, 32, 18 и 18 мкг/мл.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на блоке Voetius (ГДР). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах растворителей: хлороформ — метанол, 4 : 1 (А) и этилацетат — этанол, 4 : 1 (Б). Препаративную хроматографию на силикагеле осуществляли в системе

* ЭЦК — эффективная цитотоксическая концентрация.

¹H-ЯМР (δ, м. д.)

2'-ОН	3'-ОН	5'-ОН	Прочие сигналы	H2	NH ₂
5,34	5,12	5,43	4,10 (CH ₂)	8,04	6,98
5,35	5,28	—	10,27 (NH)	8,04	6,50
5,29	5,22	5,89	6,60 (NH ₂)	7,91	6,66
5,28	5,14	5,24		8,13	6,98
*	*	—	6,42 (NH ₂)	7,89	6,50
*	*	—		8,13	7,01
5,45	5,21	—	6,94 (NH)	7,99	6,64
5,65	5,30	—		8,15	7,32
5,38	5,37	—	12,4 (NH)	8,53	8,74
5,71	5,31	—		8,64	9,30 и 8,10
5,32	5,19	—	6,54 (NH ₂) 2,38 и 2,34 (CH ₂) 1,66 (CH) 0,86 и 0,83 (CH ₃)	7,90	6,47

хлороформ — этанол, 4 : 1. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Gilson, снабженном спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 254$ нм). Колонка (4,6 × 150 мм) была заполнена сорбентом Silasorb LC 18. Подвижная фаза — 0,01 М додецилсульфат натрия — уксусная кислота — ацетонитрил, 57,5 : 2,5 : 40. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spereord UV VIS (ГДР) в водных растворах или этаноле. Спектры ¹H-ЯМР (360 МГц) и ¹³C-ЯМР (90,5 МГц) получены на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ), оснащённом ЭВМ Aspect 2000. Внутренний стандарт — тетраметилсилан, температура образцов 30° С.

В работе использовали аденозин фирмы Reanal (Венгрия).

8-Метоксиаденозин (I) синтезировали по методу [4] с сокращением продолжительности реакции (3 вместо 18 ч). Процесс контролировали ТСХ (система Б). Выход 71%, т. пл. 202—204° С [14]: т. пл. 206—208° С).

8-Аминоаденозин (IV) получали из 8-азидоаденозина по методу [4] с использованием 1,7% Pd/C вместо 5%, пропуская водород через реакционную смесь в течение 8 ч.

8-Меркаптоаденозин (V) получали по методу [12].

8-Гидрокси-5'-дезоксиденозин (II) получали из 8-метоксиаденозина (I) хлорированием по общей методике для 8-замещенных аденозинов [1], но с удвоенным количеством НМРА. Выход 87%. УО: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 270 нм (ϵ 11 400); плечо 260 нм (ϵ 10 200); $\lambda_{\max}^{\text{pH1}}$ 267 нм (ϵ 10 200); плечо 288 нм (ϵ 9300); $\lambda_{\max}^{\text{pH1}}$ 281 нм (ϵ 14 800). Найдено, %: С 38,40; Н 4,20; N 22,37. C₁₀H₁₂ClN₅O₄ · 0,5H₂O. Вычислено, %: С 38,66; А 4,22; N 22,54.

8-Гидрокси-3',5'-циклоаденозин (III). 0,4 г (1,3 ммоль) соединения (II) растворяли в сухом DMF (3,0 мл) и нагревали 2 ч в масляной бане (140—150° С). После охлаждения выпавший осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси этанол — вода. Выход 50%. УФ: $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 296 нм (ϵ 16 000); $\lambda_{\max}^{\text{pH1}}$ 294 нм (ϵ 16 300); $\lambda_{\max}^{\text{pH1}}$ 309 нм (ϵ 12 800). Найдено, %: С 39,84; Н 3,95; N 23,02. C₁₀H₁₂ClN₅O₄. Вычислено, %: С 39,81; Н 4,01; N 23,21.

8-Амино-5'-дезоксиденозин (XV). Соединение (IV) хлорировали по описанному методу [1] смесью из 10 мл (57 ммоль) НМРА

Константы спин-спинового взаимодействия в спектрах ^1H -ЯМР (J , Гц)

Соединение	H1', H2'	H2', H3'	H3', H4'	H4', H5'a, H4', H5'b	H5'a, H5'b	H2', OH	H3', OH	Прочие КССВ
(I)	6,6	5,0	2,6	3,8 4,2	12,0	6,0	4,6	4,1 и 8,2 (H5'a, OH и H5'b, OH)
(II)	5,0	5,1	4,4	4,8 6,8	11,6	5,7	6,0	
(IV)	7,2	5,1	2,0	2,8 2,3	11,8	6,6	3,8	3,6 и 6,3 (H5'a, OH и H5'b, OH)
(V)	6,3	5,5	3,0	3,4 4,5	12,0	6,0	4,7	3,9 и 8,0 (H5'a, OH и H5'b, OH)
(VIII)	4,7	5,0	4,4	4,0 6,5	11,3			
(IX)	4,8	5,0	4,6	4,7 7,0	11,0			
(XII)	0	5,8	0	2,8 1,2	13,5	5,8	5,0	5,0 и 0 (H5'a, NH и H5'b, NH)
(XIII)	1,0	5,9	0	1,6 3,1	14,0	6,0	4,3	
(III)	0	4,5	4,5	1,8 1,3	14,8	4,0	5,8	
(XIV)	0	4,9	4,8	0,8 2,7	14,0	5,8	7,0	
(XV)	5,1	5,1	5,1	4,8 7,3	13,5	5,6	5,1	12,4 (SCH ₂) 6,6 (CH ₂ CH) 6,6 (CHCH ₃)

и 4,1 мл (57 ммоль) тионилхлорида. Реакционную смесь обрабатывали на дауэксе 50 (H⁺) и УФ-поглощающую часть упаривали в вакууме (30° С). Остаток* растворяли в 50 мл водного этанола и добавляли к раствору изобутилатиолат натрия, приготовленному из 0,7 мл (6,5 ммоль) изобутилатиола и 0,15 г (6,5 ммоль) натрия в 5 мл этанола. Кипятили 3 ч. Процесс контролировали ТСХ (система А). Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 0,01 н. HCl и нейтрализовали NaHCO₃. После охлаждения льдом выпавший осадок отфильтровывали и промывали ледяной водой. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Получили 0,2 г соединения (XV). Т. пл. 157—159° С. УФ: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 273 нм (ϵ 16 800). Найдено, %: С 47,35; Н 6,47; N 24,21; S 9,00. C₁₄H₂₂N₆O₃S. Вычислено, %: С 47,44; Н 6,26; N 23,71; S 9,05.

Кроме соединения (XV) получили 8-амино-5',8-ангидроадеозин (XII) (0,12 г), который для анализа перекристаллизовывали из воды. Т. пл. 293—297° С (разл.). УФ: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 275 нм (ϵ 19 600); $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH1}}$ 279 нм (ϵ 16 500); $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH1}}$ 277 нм (ϵ 17 900). Найдено, %: С 45,66; Н 4,59; N 31,82. C₁₀H₁₂N₆O₃. Вычислено, %: С 45,45; Н 4,58; N 31,80.

5',8-Ангидро-8-меркаптоадеозин (XIII). 1,7 г (5,7 ммоль) соединения (V) хлорировали по описанному методу [1]. После обработки на дауэксе 50 (H⁺) упаривали в вакууме (30—40° С)**, добавляли этанол, осадок отфильтровывали и промывали абс. этанолом. Осадок перекристаллизовывали из смеси этанол — вода (3 : 1). Получали соединение (XIII) — 0,53 г (чистота 99%) и 0,30 г (чистота ~96%). Общий выход 50%. Более чистый (XIII) получали после очистки технического продукта на колонке с силикагелем. После перекристаллизации из этанола т-пл. 223—225° С. УФ: $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}}$ 286 нм (ϵ 17 600); плечи — 278 нм (ϵ 15 900) и 296 нм (ϵ 11 800). $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH1}}$ 285 нм (ϵ 19 900). Найдено, %: С 41,05; Н 4,16; N 23,97; S 10,93. C₁₀H₁₁N₅O₃S·0,5H₂O. Вычислено, %: С 41,37; Н 4,17; N 24,12; S 11,04.

* Смесь анализировали ВЭЖХ и выделяли образец соединения (VIII) для ^1H -ЯМР.

** Для выделения соединения (IX) упаривание элюата проводили по возможности при максимально низкой температуре.

Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР (б, м. д.)

Соединение	C2	C4	C5	C6	C8	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'
(II)	151,0	146,8	103,6	147,2	151,5	86,1	83,3	71,5	70,3	44,9
(IX)	152,0	148,5	107,2	147,8	168,0	89,2	83,6	71,5	70,7	44,8
(XII)	150,8	149,7	117,6	154,1	154,1	90,3	88,5	78,1	72,7	49,0
(XIII)	148,5	149,8	118,0	147,1	151,7	90,8	89,1	77,1	73,4	34,4
(III)	146,7	148,3	104,8	138,2	148,7	91,7	83,2	74,5	70,7	59,2
(XIV)	148,0	149,2	108,8	139,2	164,0	94,4	83,0	73,8	70,0	59,1

5'-Дезокси-8-меркапто-5'-хлораденозин (IX). После отделения вещества (XIII) фильтрат концентрировали и разделяли на колонке с силикагелем. Фракции, содержащие соединение (IX), объединяли и повторно разделяли на силикагеле. Процесс контролировали УФ-спектроскопией. После упаривания в вакууме ** получали соединение (IX) в виде масла. УФ: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 311 нм; плечо 304 нм.

8-Меркапто-3,5'-циклоаденозин (XIV) появляется в качестве примеси соединения (XIII). УФ: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 240, 334 нм; $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}1}$ 244, 328 нм; $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}1}$ 240, 334 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зарина Д. Э., Лиепиньш Э. Э., Лидакс М. Ю. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1393—1400.
2. Kikugawa K., Ichino M. // Tetrahedron Lett. 1971. № 2. P. 87—90.
3. Hartshorn A. J., Johnson A. W., Kennedy S. M., Lappert M. F., MacQuitty J. J. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978. № 15. P. 643—644.
4. Holmes R. E., Robins R. K. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 8. P. 1772—1776.
5. Kikugawa K. // Chem. Pharm. Bull. 1977. V. 25. № 9. P. 2181—2188.
6. Zarina D. E., Liepins E. E., Lidaks M. J. // Nucl. Acids. Res. 1984. Symp. Ser. № 14. 251—252.
7. Sasaki T., Minamoto K., Itoh H. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 12. P. 2320—2325.
8. Загородний С. Г., Гнучев Ш. В., Готтлик Б. П., Дяткина И. Б., Флорентьев В. Л. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 681—695.
9. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M. // Tetrahedron. 1970. V. 26. № 24. P. 5757—5763.
10. Normant J. F., Foulon J. P., Deshayes H., Normant H. // C. r. Acad. sci. 1969. V. 269. Ser. C. № 21, P. 1325—1328.
11. Normant J. F., Deshayes H. // Bull. Soc. chim. France. 1969. № 3. P. 1001—1008.
12. Виноградова Л. В., Волков Е. М. Способ получения 8-меркаптоаденозина: А. с. 891686 СССР // Б. И. 1981. № 47. С. 414.

Поступила в редакцию
30.I.1989

CYCLIZATION OF SOME 8-SUBSTITUTED
5'-CHLORO-5'-DEOXYADENOSINES

ZARINA D. E., LIEPINS E. E., LIDAKS M. J.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR,
Riga*

Three 8-R-substituted adenosines (R = OCH₃, NH₂, SH) were chlorinated with thionyl chloride in hexamethylphosphoric triamide (HMPA) solution. The chlorination of the first derivative was accompanied by demethylation, the product, upon heating in DMF being transformed into 3,5'-cyclo-8-hydroxyadenosine. The other two adenosines showed a remarkable trend to form 5',8-cycloadenosines under chlorination conditions.

As ^1H NMR data show, 5'-chloro-5'-deoxy-8-mercaptoadenosine is able to form a 5',8- as well as 3,5'-cycle. Synthesis of 8-amino-5'-deoxy-5'-S-isobutylthioadenosine from 8-amino-5'-chloro-5'-deoxyadenosine confirmed the latter's structure. The above compounds showed moderate cytotoxicity against melanoma B 16 cells in vitro.