



УДК 547.854.4'823.07+547.857.7'823.07+577.164.13

АЛКИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ ПИРИДОКСИНОМ

Карнейский А. М., Львова С. Д., Гунар В. И.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Михайлов С. И.

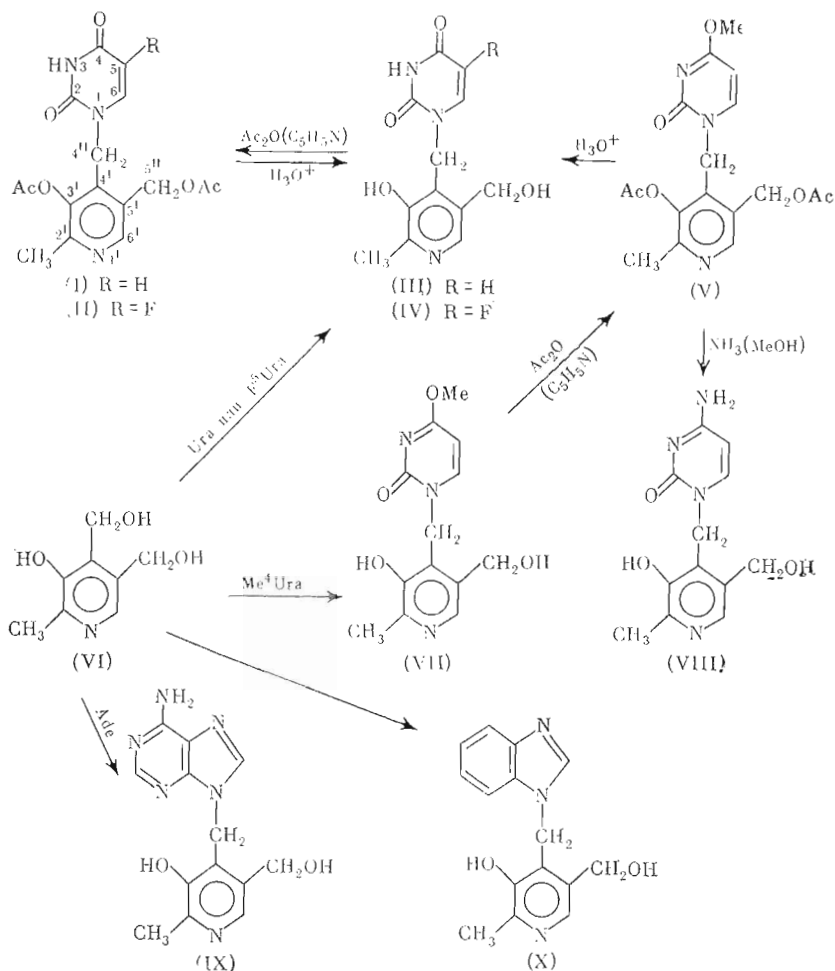
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Показана необычная способность пиридоксина алкилировать циклические амиды. Взаимодействием пиридоксина с урацилом, 5-фторурацилом, 4-О-метилурацилом, аденином и бензимидазолом получены пиридоксильные аналоги нуклеозидов: 1-(пиридоксил-4'')-урацил, 1-(пиридоксил-4'')-5-фторурацил, 1-(3',5''-ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-4-О-метилурацил, 9-(пиридоксил-4')-аденин и 1-(пиридоксил-4'')-бензимидазол, а алкилированием 1-(3',5''-ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-4-О-метилурацила — 1-(пиридоксил-4'')-цитозин.

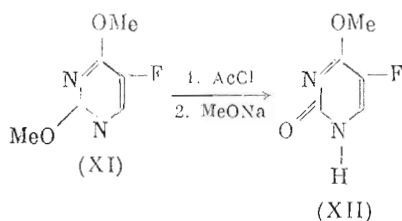
В последние годы проявляется большой интерес к синтезу негликозидных аналогов нуклеозидов, в которых углеводный остаток заменен алифатической полиоксиметиленовой цепочкой [1]. Было показано, что подобные соединения часто обладают высокой биологической активностью [1, 2]. В связи с этим представлялось интересным осуществить синтез таких аналогов нуклеозидов, в которых углеводный остаток заменен на фрагмент молекулы природного строения, например пиридоксина. Введение дополнительного хромофора пиридоксинового ядра, обладающего отличными от нуклеиновых оснований спектральными характеристиками [3], безусловно, повышает интерес к их синтезу.

Настоящее сообщение посвящено синтезу и изучению физико-химических свойств 1-(пиридоксил-4'')-пиримидинов и 9-(пиридоксил-4'')-пуринов. Для синтеза этих соединений мы использовали способность пиридоксина (VI) выступать в качестве алкилирующего агента в реакциях со спиртами и аминами [4]. Нами впервые показано, что пиридоксин способен алкилировать также и циклические амиды.

При взаимодействии пиридоксина с урацилом и его производными при повышенной температуре, по данным тонкослойной хроматографии, образуется сложная смесь соединений. Нами установлено, что оптимальные результаты могут быть достигнуты при проведении реакции в безводном диметилформамиде в заполненной аргоном ампуле, при 150—190° С в течение 6—8 ч. Алкилирование 4-О-метилурацила необходимо проводить при температуре не выше 150° С, поскольку он может давать N,N-диметилцитозин, реагируя с диметиламином, образующимся из диметилформамида при более высокой температуре.



Для повышения гидрофобности и облегчения выделения полученные пиридоксилурацилы (III), (IV) и (VII) подвергали ацелированию и затем разделяли на колонке с силикагелем. Кислотным гидролизом из диацетатов (I) и (II) получали чистые соединения (III) и (IV) соответственно. Производное 4-О-метилурацила (V) обработкой насыщенным раствором аммиака в метаноле превращали в цитозиновое производное (VIII). Мы планировали аналогичным путем получить пиридоксильный аналог 5-фторцитидина. Однако уже на стадии получения 4-О-метил-5-фторурацила (XI) при использовании модифицированного варианта реакции Гильберта — Джонсона [5] мы получили нужное соединение (XII) с выходом только 6% наряду с изомерным 2-О-метил-5-фторурацилом, 5-фторурацилом и большим количеством исходного 2,4-ди-О-метил-5-фторурацила (XI). Подобное поведение вызвано, по-видимому, наличием сильного электроакцепторного заместителя (атом F), который уменьшает нуклеофильность атома N1 молекулы (XI) и увеличивает чувствительность соседней 4-алкоксигруппы к гидролизу:



Данные УФ-спектров пиридоксильных аналогов нуклеозидов

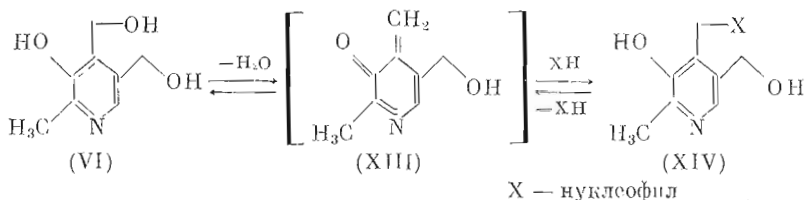
Соединение	0,1 н. HCl	0,1 н. NaOH	Соединение	0,1 н. HCl	0,1 н. NaOH
	$\lambda_{\text{макс}}(\epsilon \cdot 10^{-3})$			$\lambda_{\text{макс}}(\epsilon \cdot 10^{-3})$	
(III)	270(10)	218(14,1)	(VIII)	206(10,7)	219(13,5)
	290(7,25) плечо	248(8,5)		282(8,0)	233(11,6)
		265(7,9)		294(6,5) плечо	244(10,4)
		314(7,0)			274(9,5)
(IV)	208(14,6)	220(12,0)	(IX)	260(13,9)	218(19,0)
	279(10,8)	241(8,6)		290(8,0)	245(14,9) плечо
	287(10,2) плечо	274(7,0)			257(17,25)
		313(7,1)			314(8,7)
(V)	276(11,9)	218(16,3)	(X)	270(8,2)	220(15,1)
	282(10,8) плечо	248(8,0)		276(8,4)	248(13,8)
		275(8,0)		287(8,3)	272(6,7)
		314(8,4)			283(6,0)
				314(9,5)	

Синтезированные нами соединения являются продуктами замещения по атому N1 урацильного ядра. Во-первых, это следует из того факта, что соединение (III) образуется не только при прямом алкилировании урацила, но и при алкилировании, последующем ацилировании и кислотном гидролизе 4-О-метилурацила, в котором замещение возможно только по N1. Во-вторых, об этом свидетельствует изучение УФ-спектров полученных веществ (см. таблицу). Известно, что 1-метилурацил при pH 1 проявляет максимум поглощения 268 нм, а при pH 14—265 нм, в то время как 3-метилурацил при pH 1 имеет $\lambda_{\text{макс}}$ 259 нм, а при pH 14— $\lambda_{\text{макс}}$ 283 нм [6]. Как видно из таблицы, соединение (III) ведет себя аналогично 1-метилурацилу: в 0,1 н. HCl оно поглощает при $\lambda_{\text{макс}}$ 270 нм, а в 0,1 н. NaOH — при 265 нм. Анализ УФ-спектров показывает также, что в молекулах рассматриваемых соединений имеется как пиримидиновое, так и пиридоксильное ядро (в кислой среде катион пиридоксина имеет максимум поглощения при 290 нм, а в щелочной среде появляются два максимума, отвечающие аниону пиридоксина — 240 и 310 нм [3]). Соединения (IV), (V) и (VIII) проявляют небольшой bathochromный сдвиг по сравнению с аналогом (III), но в остальном их спектральные характеристики сходны.

Взаимодействие пиридоксина с аденином происходит при длительном нагревании раствора обоих компонентов в безводном диметилформамиде при 160° С. При анализе местоположения остатка пиридоксина в молекуле аденина мы также руководствовались данными о pH-зависимости УФ-спектров N1-, N3-, N7- и N9-замещенных аденинов [7]. Так, 9-метиладенин характеризуется максимумом поглощения при 261—262 нм, положение которого не изменяется при изменении pH. Положение максимума поглощения для пиридоксиладенина (IX) также практически не изменяется в зависимости от pH (таблица). В работе [8] сообщается, что достаточно показательным фактором при определении места алкилирования адениновой молекулы является разность величин химических сдвигов 2-Н и 8-Н аденина. Так, для 9-метиладенина эта разность составляет не более 3 Гц [8]. В случае пиридоксиладенина (IX) мы наблюдали наличие сигналов этих протонов. На основании этих данных мы считаем, что соединение (IX) имеет структуру 9-(пиридоксил-4'')-аденина.

При определении места внедрения пурина или пиримидина в 4''- или 5''-положение пиридоксинового ядра мы руководствовались данными работы [4], где имеются доказательства образования при высокой температуре хинонметидного промежуточного соединения (XIII) и, как следствие этого, образование производных (XIV) исключительно по C4''-атому пи-

ридоксина:



Существованием этого промежуточного соединения (XIII) Коритник и сотр. [9] объясняют селективное восстановление гидразином 4-CH₂OH-группы пиридоксина. Подобные промежуточные соединения постулируются и в работах [10] и [11]. Известно также, что структура соединения (XIII) образуется при фрагментации пиридоксина в условиях масс-спектрометрии [12]. На основании рассмотренных данных можно заключить, что в описываемых нами соединениях пуриновая или пиримидиновая часть находится исключительно в положении C4'' пиридоксина.

Нами также с хорошим выходом был синтезирован пиридоксилбензимидазол (X).

В масс-спектрах всех полученных соединений имеются характерные пики молекулярного иона, иона, отвечающего структуре (XIII) (151⁺), и ионов соответствующих остатков пиримидина, аденина или бензимидазола.

Экспериментальная часть

УФ-спектры измеряли на приборе Specord UV VIS (ГДР), ИК-спектры — на приборах Perkin-Elmer 180 и Specord 71 IR (ГДР). Масс-спектры записаны на приборе Jeol JMS-0,4SG2; спектры ЯМР — на приборе Hitachi (Perkin-Elmer) R-20A (Япония); сокращения: с — синглет, д — дублет, м — мультиплет. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах: ацетон — диоксан — 25% аммиак, 9:9:2 (А), хлороформ — метанол, 10:1 (Б), хлороформ — метанол, 5:1 (В).

1-(3', 5''-Ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-урацил (I). Заполненную аргоном ампулу, содержащую раствор 1 г (5,92 ммоль) основания пиридоксина (VI) [13] и 3,3 г (29,6 ммоль) урацила в 20 мл безводного диметилформамида, нагревали 8 ч при 190°С. Избыток урацила отфильтровывали и маточный раствор упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл пиридина, добавляли 10 мл уксусного ангидрида и оставляли на ночь. Растворитель удаляли в вакууме, а остаток хроматографировали на колонке (3×25 см) с силикагелем Л 40/100 мкм в системе хлороформ — метанол (20:1). Фракции, содержавшие вещество с R_f 0,48 (Б), упаривали. Получали 120 мг (6%) соединения (I), т. пл. 222–224°С (метанол); ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, δ, м.д.): 1,93 (3H, с, 2'-CH₃), 2,18 и 2,24 (3H, с, 3'-CH₃COO и 3H, с, 5''-CH₃COO), 4,65 (2H, с, 4''-CH₂), 5,00 (2H, с, 5''-CH₂), 5,32 (1H, д, 5-H, J₅₋₆ 7,5 Гц), 7,17 (1H, д, 6-H, J₆₋₅ 7,5 Гц), 8,05 (1H, с, 6'-H); масс-спектр, m/e: 347 (M⁺, 12,9%), 151 (69%), 112 (Ura⁺, 9,7%).

1-(3', 5''-Ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-5-фторурацил (II). Реакцию проводили аналогично предыдущему опыту. После удаления непрореагировавшего 5-фторурацила остаток ацетилировали, растворитель удаляли в вакууме и остаток кипятили в метаноле. Отфильтровывали 220 мг соединения (II). Маточный раствор подвергали хроматографии аналогично (I) и получали еще 100 мг соединения (II) (общий выход 15%), R_f 0,50 (Б), т. пл. 231–233°С (разл.); ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, δ, м.д.): 2,00 (3H, с, 2'-CH₃), 2,26 и 2,33 (3H, с, 3'-CH₃COO и 3H, с, 5''-CH₃COO), 4,83 (2H, с, 4''-CH₂), 5,22 (2H, с, 5''-CH₂), 7,89 (1H, д, 6-H, J_{H-F} 7,0 Гц), 8,38 (1H, с, 6-H); масс-спектр, m/e: 365 (M⁺, 13%), 151 (100%), 130 (5 F-Ura⁺, 37%).

Найдено, %: С 52,50; Н 4,42; N 11,27. C₁₆H₁₅N₃O₆F. Вычислено, %: С 52,40; Н 4,12; N 11,54.

1-(Пиридоксил-4'')-урацил (III). 100 мг соединения (I) растворяли в 5 мл 0,1 н. HCl и кипятили 15 мин, после чего упаривали досуха. К остатку прибавляли 1 мл этанола и отделяли 80 мг (93%) хлоргидрата соединения (III), R_f 0,15 (B), т. пл. 259–264° С (разл.), $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , δ , м.д.): 2,23 (3H, с, 2'-CH₃), 4,97 (2H, с, 4''-CH₂), 5,23 (2H, с, 5''-CH₂), 6,32 (1H, д, 5-H, J_{5-6} 7,5 Гц), 8,08 (1H, д, 6-H, J_{6-5} 7,5 Гц), 8,33 (1H, с, 6'-H); масс-спектр основания, m/e : 263 (M^+ , 23%), 151 (87%), 112 (Ura^+ , 23,3%).

1-(Пиридоксил-4'')-5-фторурацил (IV). Заполненную аргоном ампулу, содержащую раствор 1 г (5,92 ммоль) пиридоксина (основание) и 2,31 г (17,8 ммоль) 5-фторурацила в 15 мл безводного диметилформамида, нагревали 8 ч при 150–160° С. Избыток 5-фторурацила отделяли, маточный раствор упаривали, а остаток кипятили в метаноле. Отфильтровывали 170 мг (10,3%) соединения (II). Маточный раствор упаривали, остаток ацетилировали и после удаления растворителя подвергали хроматографии, как описано в предыдущем опыте. Выделяли 80 мг диацетата (II), который затем гидролизovali 0,1 н. HCl при 100° С в течение 30 мин, и получали 62 мг соединения (IV) (общий выход 13,8%), R_f 0,24 (B), т. пл. >250° С; ИК (KBr, ν_{max} , см⁻¹): 3020, 3120, 1700, 1400, 1220, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , δ , м.д.): 2,26 (3H, с, 2'-CH₃), 4,40 (2H, с, 4''-CH₂), 4,62 (2H, с, 5''-CH₂), 7,54 (1H, д, 6-H, $J_{\text{H-F}}$ 7,0 Гц), 7,60 (1H, с, 6'-H); масс-спектр, m/e : 281 (M^+ , 22%), 151 (100%), 130 (5F-Ura⁺, 30%). Найдено, %: N 14,69. C₁₂H₁₁N₃O₄F. Вычислено, %: N 14,94.

Соединение (IV) также получали кислотным гидролизом диацетата (II) с выходом 95%.

1-(3',5''-Ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-4-О-метилурацил (V). Заполненную аргоном ампулу, содержащую раствор 1 г (5,92 ммоль) пиридоксина и 2,4 г (19 ммоль) 4-О-метилурацила в 15 мл безводного диметилформамида, нагревали 6 ч при 148–150° С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток ацетилировали и полученную смесь хроматографировали на колонке (22×4 см) с силикагелем в хлороформе. Фракции, содержащие вещество с R_f 0,80 (B), упаривали и получали 430 мг (20%) соединения (V), т. пл. 151° С (этанол); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , δ , м.д.): 2,08 (3H, с, 2'-CH₃), 2,33 и 2,40 (3H, с, 3'-CH₃COO и 3H, с, 5''-CH₃COO), 3,87 (3H, с, 4-ОСН₃), 5,07 (2H, с, 4''-CH₂), 5,37 (2H, с, 5''-CH₂), 6,06 (1H, д, 5-H, $J_{5,6}$ 7,5 Гц), 7,94 (1H, д, 6-H, $J_{6,5}$ 7,5 Гц), 8,47 (1H, с, 6'-H); масс-спектр, m/e : 364 (M^+ , 19%), 151 (100%), 126 (4-О-Me-Ura⁺, 47,6%).

Найдено, %: C 56,51; H 5,26; N 11,69. C₁₇H₁₉N₃O₆. Вычислено, %: C 56,74; H 5,38; N 11,66.

Кислотный гидролиз 1-(3',5''-ди-О-ацетилпиридоксил-4'')-4-О-метилурацила (V). Раствор 100 мг соединения (V) в 3 мл 0,1 н. HCl кипятили 30 мин, упаривали досуха и остаток обрабатывали 1 мл этанола. Получали 80 мг (93%) соединения (III), полностью идентичного образцу, полученному при гидролизе диацетата (I).

1-(Пиридоксил-4'')-цитозин (VIII). Ампулу, содержащую раствор 140 мг соединения (V) в 5 мл метанола, насыщенного при 0° С аммиаком, нагревали 8 ч при 150° С. Реакционную смесь упаривали досуха и остаток перекристаллизовывали из воды. Получали 90 мг (90%) соединения (VIII), R_f 0,08 (B), т. пл. 256–257,5° С (разл.), ИК (KBr, ν_{max} , см⁻¹): 3360, 3140, 1730, 1680, 1540, 1470, 1275; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , δ , м.д.): 2,36 (3H, с, 2'-CH₃), 4,58 (2H, с, 4''-CH₂), 4,94 (2H, с, 5''-CH₂), 5,80 (1H, д, 5-H, $J_{5,6}$ 7,5 Гц), 7,83 (1H, д, 6-H, $J_{6,5}$ 7,5 Гц), 7,90 (1H, с, 6'-H); масс-спектр, m/e : 262 (M^+ , 25%), 151 (16,7%), 96 (Cyt^+ , 31,2%).

Найдено, %: C 53,31; H 5,44; N 20,80. C₁₂H₁₃N₃O₃· $\frac{1}{2}$ H₂O. Вычислено, %: C 53,12; H 5,57; N 20,66.

9-(Пиридоксил-4'')-аденин (IX). Заполненную аргоном ампулу, содержащую раствор 1 г (5,92 ммоль) пиридоксина (основание) и 1,2 г (8,8 ммоль) аденина в 20 мл безводного диметилформамида, нагревали 6 ч при 160° С. Растворитель удаляли в вакууме и остаток кристаллизовали

из воды. Полученную таким образом смесь, состоящую из аденина и соединения (IX), кристаллизовали из 10% HCl, получали 160 мг дихлоргидрата соединения (IX). Маточный раствор подвергали хроматографии на колонке (45×2 см) со смолой дауэкс 50W×8 (H⁺) в линейном градиенте концентраций HCl (6—12%). Фракции, содержащие соединение (IX), упаривали досуха и получали еще 140 мг (общий выход 16%) дихлоргидрата пиридоксиладенина (IX), *R_f* 0,12 (A), т. пл. 297° С (разл.). ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 2,75 (3H, с, 2'-CH₃), 5,17 (2H, с, 4''-CH₂), 5,82 (2H, с, 5''-CH₂), 8,37 (1H, с, 6'-H), 8,53 (1H, с, 2-H), 8,53 (1H, с, 8-H), масс-спектр основания, *m/e*: 286 (M⁺, 17,5%), 151 (7%), 135 (Ade⁺, 100%).

Найдено, %: С 43,03; Н 4,17; N 23,73. C₁₃H₁₄N₆O₂·2HCl. Вычислено, %: 43,46; Н 4,49; N 23,39.

1-(Пиридоксил-4'')-бензимидазол (X). Заполненную аргоном ампулу, содержащую раствор 1 г (5,92 ммоль) пиридоксина (основание) и 1,1 г бензимидазола в 10 мл безводного диметилформамида, нагревали 4 ч при 150° С. Растворитель удаляли в вакууме и непрореагировавший бензимидазол экстрагировали из остатка эфиром. Оставшееся кристаллическое вещество кипятили 10 мин в метаноле, охлаждали и отфильтровывали 1,0 г продукта. Полученный осадок растворяли в 10% HCl и обесцвечивали кипячением в течение 30 мин с активированным углем. Уголь отделяли, фильтрат упаривали и остаток перекристаллизовывали из водного этанола. Получали 900 мг (50%) хлоргидрата соединения (X), *R_f* 0,17 (A), т. пл. 195—197° С. ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м.д.): 2,77 (3H, с, 2'-CH₃), 5,04 (2H, с, 4''-CH₂), 6,03 (2H, с, 5''-CH₂), 7,82 (4H, м, бензольное ядро), 8,42 (1H, с, 6-H), 9,32 (1H, с, 2-H); масс-спектр основания, *m/e*: 269 (M⁺, 15,9%), 151 (9,09%), 118 ([бензимидазол]⁺, 100%).

Найдено, %: С 52,2; Н 4,96; N 11,65. C₁₅H₁₅N₃O₂·2HCl. Вычислено, %: С 52,64; Н 5,01; N 12,27.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Clercq E., Torrence P. F. (1978) *J. Carboh. Nucleosides, Nucleotides*, 5, 187—224.
2. Кривцын А. М., Флорентьев В. Л. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 149—171.
3. Johnson R. J., Metzler D. E. (1970) in: *Methods in Enzymology* (McCormick D. B., Wright L. D., eds), vol. 18A, pp. 433—471.
4. Frater-Schroder M., Mahrer-Busato M. (1975) *Bioorg. Chem.*, 4, 332—341.
5. Holy A., Ivanova G. S. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 19—34.
6. Albert A. (1973) in: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., eds), vol. 2, pp. 47—123. Wiley — Interscience.
7. Leonard N. J., Deurup J. A. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 2148—2160.
8. Townsend L. B., Robins R. K., Loepky R. N., Leonard N. J. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 5320—5325.
9. Korytnyk W., Ahrens H. (1971) *J. Med. Chem.*, 14, 947—952.
10. Makino K., Murakami Y., Kobayashi Y. (1967) *International Symposium on Pyridoxal Enzymes*, Nagoya, Marusen Co. Ltd, Tokyo, 1968, p. 129.
11. Kobayashi Y., Makino K. (1968) *Yikeikai Med. J.*, 15, 249.
12. De Jongh D. S., Korytnyk W. (1970) in: *Methods in Enzymology* (McCormick D. B., Wright L. D., eds), vol. 18A, pp. 483—488.
13. Патент Японии № 27225 (1972) *Chem. Abstr.* (1972) 77(19), 126436e.

Поступила в редакцию
4.X.1979

ALKYLATION OF NUCLEIC BASES WITH PYRIDOXINE

KARPEISKY A. M., L'VOVA S. D., GUNAR V. I., MIKHAILOV S. N.
*All-Union Institute of Vitamin Research, Moscow; Institute
of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis of pyridoxine analogs of nucleosides was carried out. An unusual alkylating capacity of pyridoxine towards cyclic amides was revealed. The reaction of pyridoxine with uracyl, 5-fluorouracyl, 4-O-methyluracyl, adenine and benzimidazole afforded the following pyridoxine analogs of nucleosides: 1-(pyridoxyl-4'')-uracyl, 1-(pyridoxyl-4'')-5-fluorouracyl, 1-(3',5''-di-O-acetylpyridoxyl-4'')-4-O-methyluracyl, 9-(pyridoxyl-4'')-adenine and 1-(pyridoxyl-4'')-benzimidazole. Amination of 1-(3',5''-di-O-acetylpyridoxyl-4'')-4-O-methyluracyl gave 1-(pyridoxyl-4'')-cytosine.