



УДК 547.854'4.057

ПОЛИМЕТИЛЕНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ С ω -ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ. III. N-[7-(2-ОКСОЦИКЛОГЕКСИЛ)-7-ОКСОГЕПТИЛ]- ЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРИМИДИНЫ

© 2004 г. А. М. Крицын[#], В. В. Комиссаров

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Поступила в редакцию 02.07.2003 г. Принята к печати 17.10.2003 г.

Алкилированием урацила, тимина и цитозина 7-хлоргептаноилциклогексаном-2 синтезированы новые полиметиленовые производные нуклеиновых оснований с β -дикетофункцией в ω -положении, изучены их физико-химические свойства.

Ключевые слова: нуклеозиды, полиметиленовые аналоги, алкилирование.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что полиметиленовые производные нуклеиновых оснований, несущие в ω -положении углеродной цепи (более 4-х атомов углерода) различные функциональные группы, – удобные и перспективные инструменты для изучения функционирования ферментов нуклеинового обмена [1, 2]. Так, было обнаружено, что подобные производные тимина и урацила способны эффективно взаимодействовать с участком обратной транскриптазы ВИЧ, отвечающим за узнавание антикодона тРНК^{Lys}, и активировать этот фермент. При изучении взаимодействия с ДНК-топоизомеразой I оказалось, что такие производные слабо ингибируют фермент, причем активность производных урацила была выше, чем у производных тимина.

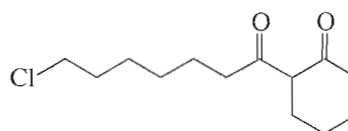
Недавно было показано, что эффективными ингибиторами интегразы ВИЧ-1 служат 4-арил-2,4-диоксобутановые кислоты [3–5]. Хотя механизм действия и особенности связывания этих соединений с интегразой ВИЧ-1 точно не установлены, было показано, что наличие β -дикетонного фрагмента является одним из факторов, определяющих активность структур такого типа [6]. Кето-енольная таутомерия, присущая β -дикетонам, может вносить вклад во взаимодействие с соответствующими ферментами или рецепторами, учитывая тот факт, что значения рН вблизи их активных центров могут существенно отличаться от физиологических.

Среди немногочисленных описанных представителей полиметиленовых производных нуклеиновых оснований, несущих в ω -положении углеродной цепи функциональные группы, неизвестны соединения с β -дикетонным фрагментом, а простые пути к их получению не вполне очевидны. В настоящей работе описан синтез первых пириимидиновых производных такого типа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения неизвестных ранее полиметиленовых производных пириимидиновых оснований, имеющих в ω -положении цепи β -дикетофункцию, нами был выбран метод, основанный на алкилировании 2-(7-хлоргептаноил)циклогексаном-2 (I) нуклеинового основания или его защищенного производного.

Алкилирующий реагент, 2-(7-хлоргептаноил)циклогексанон-2 (I), был получен по методике, описанной в работе А.Н. Несмеянова и сотр. [7], – ацилированием в мягких условиях морфолинового енамина циклогексана [8] хлорангидридом 7-хлоргептановой кислоты. Последующий кислотный гидролиз ацилированного енамина приводил к целевому 1,3-дикетону (I). Следует отметить, что помимо дикетона (I) в данной реакции образуется значительное количество вещества, имеющего существенно более низкую температуру кипения, строение которого не устанавливали.

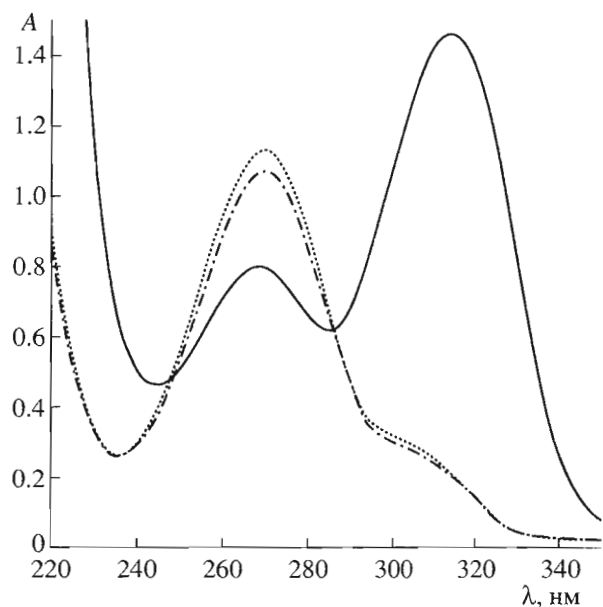


(I)

Сообщение II см. [1].

Сокращение: DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 135-98-05; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: amk@eimb.ru).



УФ-спектр N^1 -[7-(2-оксоциклогексил)-7-оксогептил]урацила (IV); --- рН 1, ··· рН 7, — рН 14.

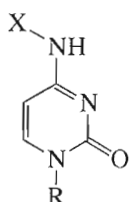
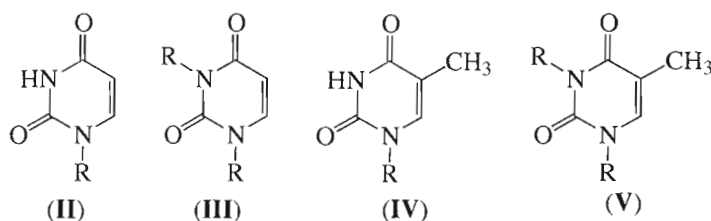
Как нами показано в работе [2], алкилирование 2,4-дигидроксиимидинов галоидными алкилами в DMF в присутствии 1,8-диазобидцикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU) приводит с хорошими выходами к N^1 -замещенным производным (метод А). Соот-

ветствующие N^1 -[7-(2-оксоциклогексил)-7-оксогептил]производные урацила (II) и тимина (IV) были получены этим способом с выходами 30–40%. Отделение целевых производных (II) и (IV) от продуктов N^1,N^3 -бисалкилирования, соответственно (III) и (V), составляющих ~5%, проводилось колоночной хроматографией на силикагеле.

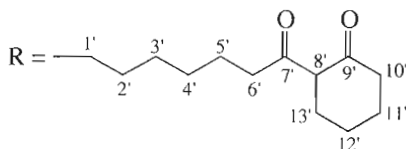
При алкилировании цитозина хлоридом (I) по методу А образовывалась многокомпонентная смесь. Из этой смеси целевое вещество (VIa) было выделено с выходом всего лишь 6%. В связи с этим были проверены другие пути получения целевого продукта.

В реакцию алкилирования хлоридом (I) по методу А вводили цитозин, в котором экзоциклическая аминогруппа была защищена бензоильной. В присутствии DBU образовывалось соединение (VIб). Удаление N^4 -бензоильной группы действием 5 М раствора аммиака в метаноле в течение 24 ч при 20°C (аналогично работе [9]) с последующей очисткой продукта на колонке с катионитом Dowex 50 × 8 (H^+ -форма) давало искомым дикетон (VIa) с суммарным выходом 27%.

В другом случае алкилировали натриевую соль, получаемую обработкой цитозина гидридом натрия в DMF (метод Б). Это позволило не только избежать защиты экзоциклической аминогруппы (как в методе А), но и повысило выход целевого производного цитозина (VIa) до 43%.



(VIa), (VIб) a: X = H; б: X = Bz.



Строение полученных алкилированных пиридинонов (II)–(VI) подтверждено данными ЯМР-, УФ- и масс-спектрометрии (см. табл. 1, 2 и “Эксперимент. часть”).

Следует отметить, что по данным УФ-спектров в кислых и нейтральных водных растворах β-дикетонный фрагмент соединений (II)–(VI) енолизирован незначительно. При повышении рН

доля енольной формы возрастает, что выражается в появлении максимума поглощения в области 315 нм. В качестве примера такой зависимости приведены УФ-спектры тиминового производного (IV) (рисунок). Напротив, в неводной среде (DMSO, $CDCl_3$), по данным ЯМР-спектроскопии, β-дикетонный фрагмент практически полностью (более 90%) енолизирован.

Таблица 1. Данные ¹H-ЯМР-спектров синтезированных соединений (δ, м.д.; КССВ, Гц)

Протоны	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VIa)	(VIb)
H3	8.99 (1 H, c)	—	7.99 (1 H, c)	—	—	—
H5	5.68 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)	5.64 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)	—	—	5.6 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.7)	5.63 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)
H6	7.14 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)	7.1 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)	6.95 (1 H, c)	6.92 (1 H, c)	7.9 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.7)	6.88 (1 H, д, <i>J</i> _{5,6} 7.8)
5-Me	—	—	1.9 (3 H, c)	1.87 (3 H, c)	—	—
4-NH ₂	—	—	—	—	6.75 (2 H, c)	—
4-NHBz	—	—	—	—	—	7.24 (1 H, c)
PhCO-	—	—	—	—	—	<i>o</i> -7.89 (2 H, д, <i>J</i> _{<i>o,m</i>} 7.5) <i>m</i> -7.5 (2 H, м) <i>n</i> -7.59 (1 H, т, <i>J</i> _{<i>n,m</i>} 7.8)
H1'	3.72 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.2)	3.86 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.5)	3.67 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.5)	3.88 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.8)	3.65 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.2)	3.89 (2 H, т, <i>J</i> _{1',2'} 7.2)
H1''	—	3.66 (2 H, т, <i>J</i> _{1'',2''} 7.2)	—	3.65 (2 H, т, <i>J</i> _{1'',2''} 7.2)	—	—
H2'-H5'	1.36 (8 H, м)	1.36 (16 H, м)	1.36 (8 H, м)	1.36 (16 H, м)	1.36 (8 H, м)	1.36 (8 H, м)
H2''-H5''	—	—	—	—	—	—
H6'	2.41 (2 H, т, <i>J</i> _{6,5'} 7.5)	2.34 (4 H, м)	2.4 (2 H, т, <i>J</i> _{6,5'} 7.5)	2.35 (4 H, м)	2.41 (2 H, т, <i>J</i> _{6,5'} 7.5)	2.41 (2 H, т, <i>J</i> _{6,5'} 7.5)
H6''	—	—	—	—	—	—
9'-ОН	15.9 (1 H, c)	15.9 (1 H, c)	15.9 (1 H, c)	15.92 (1 H, c)	15.9 (1 H, c)	15.9 (1 H, c)
9''-ОН	—	15.95 (1 H, c)	—	15.96 (1 H, c)	—	—
H10', H13'	2.3 (4 H, м)	2.3 (8 H, м)	2.3 (4 H, м)	2.3 (8 H, м)	2.3 (4 H, м)	2.3 (4 H, м)
H10'', H13''	—	—	—	—	—	—
H11', H12'	1.38 (4 H, м)	1.38 (8 H, м)	1.38 (4 H, м)	1.38 (8 H, м)	1.38 (4 H, м)	1.38 (4 H, м)
H11'', H12''	—	—	—	—	—	—

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали урацил, тимин, цитозин (Sigma, США), DBU (Aldrich, США), гидрид натрия (80% суспензия в минеральном масле, Fluka, Швейцария), ионообменную смолу Dowex 50 × 8 (Serva, Германия).

Очистку и обезвоживание растворителей проводили по стандартным методикам [10]. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cary 50 (Varian, Австралия) при pH 1, 7 и 14; приведены значения λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹). Масс-спектры получали на приборе MS-30 (Kratos, Япония); метод ионизации – электронный удар. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AMXIII-400 (Германия) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-спектров и 100 МГц для ¹³C-спектров при 300 К в DMSO-*d*₆ (если не указан другой растворитель); в качестве стандарта использовали тетраметилсилан; указаны химические сдвиги в миллионных долях и КССВ – в герцах. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), исполь-

зуя системы: хлороформ (А); хлороформ–этанол, 19 : 1 (Б). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (Chemapol, ЧССР).

7-Хлоргептаоилциклогексанон-2 (I). К раствору 37 г (0.22 моль) *N*-(1-циклогексен-1-ил)морфолина [8] и 35.5 мл (0.25 моль) триэтиламина в 250 мл сухого хлороформа прибавляли по каплям при перемешивании раствор 36.6 г (0.2 моль) хлорангидрида 7-хлоргептановой кислоты в 100 мл хлороформа и оставляли на 14 ч при 20°C. При энергичном перемешивании прибавляли по каплям раствор 60 мл конц. H₂SO₄ в 80 мл воды, кипятили с обратным холодильником при перемешивании 4 ч, охлаждали, органический слой отделяли, водный экстрагировали (2 × 100 мл) хлороформом, вытяжки объединяли, сушили Na₂SO₄, растворитель упаривали. Остаток перегоняли в вакууме. Выход 29.7 г (60.7%). Т. кип. 147–149°C/1 мм рт.ст. Масс-спектр: *m/z* 244.8 [M⁺]; рассчитано для C₁₃H₂₁ClO₂ M 244.8. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.02 (2 H, м, H4'), 1.08 (2 H, м, H5'), 1.24 (2 H, м, H6'), 1.30 (4 H,

Таблица 2. Данные ^{13}C -ЯМР-спектров синтезированных соединений

Атомы углерода	Соединение, δ , м. д.					
	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VIa)	(VIb)
C2	150.9	151.3	150.8	151.3	156.4	166.2
C4	163.75	162.95	164.1	163.65	165.5	170.0
C5	102.25	101.5	107.8	109.6	93.8	93.5
C6	144.5	142.0	140.5	138.2	141.4	148.9
5-Me	–	–	12.4	12.9	–	–
PhCO-	–	–	–	–	–	213.0 (CO), 127.7 (м), 129.2 (о), 133.2 (п)
C1'	48.9	49.6	48.6	49.3	50.1	51.1
C1''	–	41.0	–	41.3	–	–
C2'	31.25	32.7	31.25	31.09	31.25	31.25
C2''	–	32.3	–	31.03	–	–
C3'	28.9	28.76	28.9	28.97	28.9	28.9
C3''	–	28.73	–	28.87	–	–
C4'	26.4	27.73	26.4	26.7	26.5	26.5
C4''	–	26.67	–	26.3	–	–
C5'	29	31.08	29.2	28.8	29.0	29.0
C5''	–	31.02	–	27.4	–	–
C6'	36.8	36.7	36.8	36.7	36.8	36.8
C6''	–	36.6	–	36.6	–	–
C7'	201.4	201.3	201.4	201.3	201.4	201.4
C7''	–	201.1	–	201.2	–	–
C8'	106.9	106.6*	106.9	106.7*	106.9	106.9
C8''	–	–	–	–	–	–
C9'	181.8	181.62	181.8	181.64	181.8	181.8
C9''	–	181.56	–	181.57	–	–
C10'	28.9	28.7	28.8	28.9	28.9	28.7
C10''	–	28.8	–	28.7	–	–
C11'	21.8	21.61	21.8	23.61	21.8	21.8
C11''	–	21.57	–	21.58	–	–
C12'	23.0	24.07	23.0	22.81	23.0	23.0
C12''	–	23.83	–	22.78	–	–
C13'	24.0	–	24.0	–	24.3	24.2
C13''	–	23.71**	–	23.7**	–	–

* Сигнал совпадает для атомов C8' и C8''.

** Сигнал совпадает для атомов C13' и C13''.

м, Н4, Н5), 1.40 (2 Н, м, Н3'), 1.94 (4 Н, м, Н6, Н3), 2.05 (2 Н, т, $J_{2,3}$ 7.0, Н2'), 3.16 (2 Н, т, $J_{7,6}$ 6.5, Н7'), 15.6 (1 Н, с, 1-ОН). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 22.75 (С4), 22.99 (С5), 23.99 (С3'), 25.82 (С3), 27.65 (С5'), 29.96 (С4'), 31.58 (С6'), 35.81 (С2'), 44.00 (С6), 44.98 (С7'), 105.59 (С2), 179.8 (С1), 200.58 (С1').

Алкилирование пиримидиновых оснований 7-хлоргептаинолициклогексаноном-2 с использованием в качестве основания DBU (метод А). К суспензии 10 ммоль пиримидинового основания или его защищенного производного в 25 мл абсолютного DMF прибавляли 3.7 г (15 ммоль) алкилирующего агента (I) и 2.3 г (15 ммоль) DBU. Реакционную массу выдерживали 20 ч при 80–100°C. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Реакционную массу охлаждали, упаривали в вакууме. Остаток суспендировали в хлороформе и хроматографировали на колонке 5 × 28 см с силикагелем, элюент – градиент этанола в хлороформе 0 → 10%. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток перекристаллизовывали из водно-спиртовых смесей или спирта.

Алкилирование натриевой соли цитозина 7-хлоргептаинолициклогексаноном-2 (метод Б). К суспензии 1.2 г (10 ммоль) цитозина в 25 мл абсолютного DMF при перемешивании прибавляли 0.33 г (11 ммоль) гидрида натрия (80% суспензия в минеральном масле). После получасового перемешивания при 20°C добавляли 2.9 г (12 ммоль) алкилирующего реагента (I). Реакционную массу выдерживали при 80–100°C в течение 20 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. После упаривания DMF в вакууме реакционную массу встряхивали со смесью 20 мл воды и 50 мл хлороформа. Органическую фазу отделяли, водную экстрагировали хлороформом (5 × 70 мл). Экстракты объединяли, сушили безводным сульфатом натрия, остаток после упаривания растворителя хроматографировали на колонке с силикагелем как указано выше. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток перекристаллизовывали из спирта.

N^1 -[7-(2-Оксоциклогексил)-7-оксогептил]урацил (II) получали по методу А с выходом 35%, R_f 0.59 (А), т. пл. 79–81°C (вода–этанол 1 : 3), УФ-спектр, рН 1: 270 (17700); рН 7: 270 (18800); рН 14: 269 (13200), 315 (24100). Масс-спектр: m/z 320 [M^+]; рассчитано 320 ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$).

N^1, N^3 -Бис[7-(2-оксоциклогексил)-7-оксогептил]урацил (III) получали по методу А с выходом 3%, R_f 0.23 (Б), УФ-спектр, рН 1: 286 (11400); рН 7: 286 (12300); рН 14: 280 (9600), 313 (22400). Масс-спектр: m/z 529 [M^+]; рассчитано 529 ($\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6$).

N^1 -[7-(2-Оксоциклогексил)-7-оксогептил]тимин (IV) получали по методу А, выход 39%, R_f 0.645 (А), т. пл. 119–120°C (вода–этанол 1 : 2), УФ-спектр, рН 1: 275 (14500); рН 7: 276 (16200); рН 14:

278 (12000), 315 (19800). Масс-спектр: m/z 334 [M^+], рассчитано 334 ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$).

N^1, N^3 -Бис[7-(2-оксоциклогексил)-7-оксогептил]тимин (V) получали по методу А с выходом 4%, R_f 0.31 (А), УФ-спектр, рН 1: 290 (17900); рН 7: 290 (19000); рН 14: 285 (17700), 315 (25200). Масс-спектр: m/z 543 [M^+]; рассчитано 543 ($\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$).

N^1 -[7-(2-Оксоциклогексил)-7-оксогептил]цитозин (VIa) получали по методу А с выходом 6%, по методу Б с выходом 43%. R_f 0.07 (А), т. пл. 157–159°C (этанол), УФ-спектр, рН 1: 286 (15800); рН 7: 277 (11400); рН 14: 281 (11400), 315 (16400). Масс-спектр: m/z 319 [M^+], рассчитано 319 ($\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$).

N^1 -[7-(2-Оксоциклогексил)-7-оксогептил]- N^4 -бензоилцитозин (VIб) получали по методу А, выход 30.5%, R_f 0.67 (А), т. пл. 132–134°C (вода–этанол 4 : 5). Масс-спектр: m/z 423.5 [M^+], рассчитано 423.5 ($\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$).

Удаление бензоильной защитной группы. Выдерживали 0.25 г (0.6 ммоль) производного цитозина (VIб) в 25 мл 5 М раствора аммиака в метаноле при комнатной температуре. Через 24 ч (контроль ТСХ) реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 15 мл этанола и наносили на колонку с катионитом Dowex 50 × 8 (H^+ -форма). Колонку промывали водой и спиртом. Продукт с колонки смывали смесью спирт–конц. водн. аммиак 4 : 1 (150 мл). После упаривания растворителя получали 0.17 г (89%) производного (VIa), имеющие физико-химические характеристики, идентичные характеристикам производного, полученного по методам А и Б.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.Р. Хомутова за плодотворное обсуждение полученных результатов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 03-04-49224).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макинский А.А., Крицын А.М., Ульянова Е.А., Захарова О.Д., Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // Биоорганическая химия. 2001. Т. 27. С. 191–196.
2. Макинский А.А., Крицын А.М., Ульянова Е.А., Захарова О.Д., Невинский Г.А. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 735–742.
3. Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Miller M.D. // Science. 2000. V. 287. P. 646–650.
4. Espeseth A., Felock P., Wolfe A., Witmer M., Grobler J., Anthony N., Egbertson M., Melamed J.Y., Young S., Hamill T., Cole J.L., Hazuda D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11244–11249.
5. Wai J.S., Egbertson M.S., Payne L.S., Fisher T.E., Embrey M.W., Tran L.O., Melamed J.Y., Langford H.M.,

- Guare J.P., Zhuang L., Grey V.E., Vacca J.P., Holloway M.K., Naylor-Olsen A.M., Hazuda D.J., Fellock P.J., Wolfe A.L., Stillmock K.A., Schleif W.A., Gabryelski L.J., Young S.D.* // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 4923–4926.
6. *Grobler J.A., Stillmock K., Hu B., Witmer M., Felock P., Espeseth A.S., Wolfe A., Egbertson M., Bourgeois M., Melamed J., Wai J.S., Young S., Vacca J., Hazuda D.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6661–6666.
7. *Несмеянов А.Н., Захаркин Л.И., Кост Т.А., Фрейдлина Р.Х.* А.Н. Несмеянов. Избранные труды. М.: АН СССР, 1959. Т. 3. С. 466–472.
8. *Физер Л., Физер М.* Реагенты для органического синтеза. Пер. с англ. М.: Мир, 1970. Т. 2. С. 314.
9. *Zorbach W.W., Tipson R.S.* *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry.* New York; London; Sydney; Toronto: John Wiley and Sons Inc., 1968. V. 1. P. 291.
10. *Тутце Л., Айхер Т.* Препаративная органическая химия: Пер. с нем. М.: Мир, 1999.

Polymethylene Derivatives of Nucleic Bases with ω -Functional Groups. III. *N*-[7-(2-Oxocyclohexyl)-7-oxoheptyl]-Substituted Pyrimidines

A. M. Kritzyn[#] and V. V. Komissarov

[#]Phone: +7(095) 135-98-05; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: amk@imb.ru
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

New polymethylene derivatives of nucleic bases containing a β -dioxo function at the ω -position were synthesized by alkylation of uracil, thymine, and cytosine with 1-(7-chloroheptanoyl)cyclohexan-2-one, and their physicochemical properties were studied. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alkylation, nucleosides, polymethylene analogues