

Изучение механизмов йодирования 5'-О-защищенных пиримидиннуклеозидов в условиях реакции Арбузова

В. Г. Костина, А. С. Шаламай, Л. С. Усенко, В. А. Гладкая

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

В условиях реакции Арбузова изучен механизм йодирования углеводного фрагмента 5'-О-защищенных пиримидиннуклеозидов. Показано, что введение йода в С2- и С3-положения протекает через образование промежуточных квазифосфониевых солей с последующей их трансформацией вследствие внутримолекулярных превращений. Установлено, что стерический и кинетический факторы поэтапных реакций определяют последовательность, скорость образования и дальнейшее превращение С2- и С3-квазифосфониевых солей и других активных синтонов.

Введение. 2',3'-Дидезоксинуклеозиды являются мощными ингибиторами процесса элонгации при биосинтезе ДНК. Среди них выявлены активные антиретровирусные препараты, некоторые из которых нашли применение в терапии ВИЧ-инфекции [1]. Высокую антивирусную активность проявляют также 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксипроизводные пиримидиннуклеозидов [2]. В последнее время разработана лекарственная форма 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокситимидина (D4Т) — препарат ставудин, по терапевтическим показателям значительно превосходящий зидовудин (азидотимидин) [3]. Методология синтезов модифицированных по углеводному фрагменту нуклеозидов в большинстве случаев включает всевозможные реакции деоксигенирования рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов, в том числе восстановительного дегалогенирования соответствующих бром- и йодпроизводных [4, 5]. Перспективными путями получения этих соединений могут быть реакции галоидирования 5'-О-защищенных нуклеозидов с помощью галоидпроизводных фосфора или реакции расщепления $O_2,2'$ - либо $O_2,3'$ -циклопроизводных пиримидиннуклеозидов [6—8].

На примере синтезов 2'- или 3'-галоиднуклео-

зидов с участием фосфониевых солей $Ph_3P^+X^-$ (X -галлоид) либо $(PhO)_3P^+CH_3J^-$ достаточно хорошо изучены механизмы этих реакций [6, 7]. Показано, что галоидирование углеводного фрагмента нуклеозидов всегда начинается со стадии образования соответствующих квазифосфониевых солей. Последние в зависимости от нуклеофильности галоид-анионов могут вовлекаться в реакции $O_2,2'$ - и/или $O_2,3'$ -циклизации либо подвергаться перегруппировке Арбузова. $O_2,2'$ - и $O_2,3'$ -циклопроизводные как высокореакционные синтоны вследствие нуклеофильной атаки галоид-анионами и протонирования N_4 -атома агликона превращаются в соответствующие галоиднуклеозиды. Галоидпроизводные, образующиеся в результате перегруппировки Арбузова, имеют противоположное аномерное строение, поскольку их конфигурация определяется условиями SN_2 -нуклеофильных превращений. Предпочтительность реакции $O_2,2'$ -циклизации обусловлена не только более высокой нуклеофильностью O_2 -атома агликона в сравнении с галоид-анионом, но обеспечивается также пространственной сближенностью этих реакционных центров.

При галоидировании защищенных пиранозных форм углеводов было установлено, что эффективными галоидирующими агентами являются смеси $Ph_3PX^+X^-$ (X -Br или J) с имидазолом (Im) или

трийсдимидазолом, то есть фосфониевая соль $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImX}^-$ *in situ* [9—11].

Изучение реакций 5'-О-бензоил-О₂,2'-циклоуридина с различными галоидфосфопродуктами позволило разработать варианты получения 2'-галоид-, 2',3'-дигалоид- и 2',3'-дидегидропроизводных уридина [12, 13]. Показано, что последнее соединение образуется вследствие спонтанного дегалоидирования промежуточного нестабильного 2',3'-дидегидропроизводного. При йодировании О₂,2'-циклоуридина последовательно с помощью $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$ и $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImJ}^-$ происходит раскрытие О₂,2'-циклоэфира, затем введение йода в С₃-положение фуранозы в условиях перегруппировки Арбузова — через стадии образования квазифосфониевой соли и нуклеофильного замещения ее йод-анионом [2].

По-видимому, в 5'-О-защищенных пиридиннуклеозидах — урдине и тиминрибозиде (Ia—г) при наличии двух вторичных 2'- и 3'-гидроксильных групп с различными реакционными свойствами замещение их на йод с помощью $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImJ}^-$ также должно протекать аналогично вышеизложенному.

В этой связи при инвариантности взаимодействия 5'-О-защищенных нуклеозидов (Ia—г) с $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImJ}^-$ целесообразным было изучить эти реакции поэтапно, подбирая на отдельных стадиях соотношения реагирующих веществ и анализируя продукты реакций, что позволило бы установить в целом механизм йодирования углеводного остатка пиридинных нуклеозидов.

Материалы и методы. Исходные 5'-О-бензоилпроизводные уридина (Ia), тиминрибозиды (Iб) и 5'-О-третилпроизводные уридина (Iв) и тиминрибозиды (Iг) получали в соответствии с описанными методиками [14—16]. Трифенилйодфосфоний йодид ($\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$) и трифенилимидазолфосфоний йодид ($\text{Ph}_3\text{P}^+\text{ImJ}^-$) использовали в реакции *in situ* в соответствии со схемой (рисунок) при смешении исходных реагентов.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проб реакционных смесей и продуктов реакций выполняли на пластинках Kieselgel F₂₅₄ («Merck», ФРГ) в системах растворителей хлороформ—метанол (4 : 1) (А), (9 : 1) (Б). Очистку и выделение конечных продуктов проводили при помощи колоночной хроматографии (КХ) на силикагеле Kieselgel G60 («Merck»), используя в качестве элюентов хлороформ и его смеси с метанолом. Температуру плавления веществ определяли на приборе Бютиуса (ФРГ). УФ спектры соединений записывали на спектрофотометре «Spccord UV vis» в этаноле. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на приборах «Bruker WP-200» (200 МГц) и «Varian VXR 300» (300 МГц)

в дейтерохлороформе с внутренним стандартом тетраметилсиланом.

Данные элементного анализа соединений были близкими к рассчитанным и их отклонения находились в пределах ± 0,3 %.

Получение 5'-О-защищенных О₂,2'-циклопроизводных нуклеозидов (IIIa—г). Смешали 1,75—2,7 ммоль Ph_3P и 1,75—2,7 ммоль йода в 8 мл сухого диоксана. К полученной желтой суспензии $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$ при перемешивании добавили раствор 1 ммоль одного из 5'-О-защищенных нуклеозидов (Ia—г) и 3,5—6,2 ммоль имидазола в 5 мл сухого ацетонитрила. Реакционную массу выдержали при 35—50 °С 2—4 ч, затем разбавили 20 мл смеси этилацетат—бензол (1 : 1), промыли водой (3 × 10 мл). Водный слой отделили и экстрагировали смесью этилацетат—бензол (1 : 1) (3 × 10 мл) до отсутствия в экстракте нуклеозида (ТСХ). Объединенные органические экстракты высушили над Na_2SO_4 и упарили в вакууме досуха. Маслообразный остаток очистили при помощи КХ.

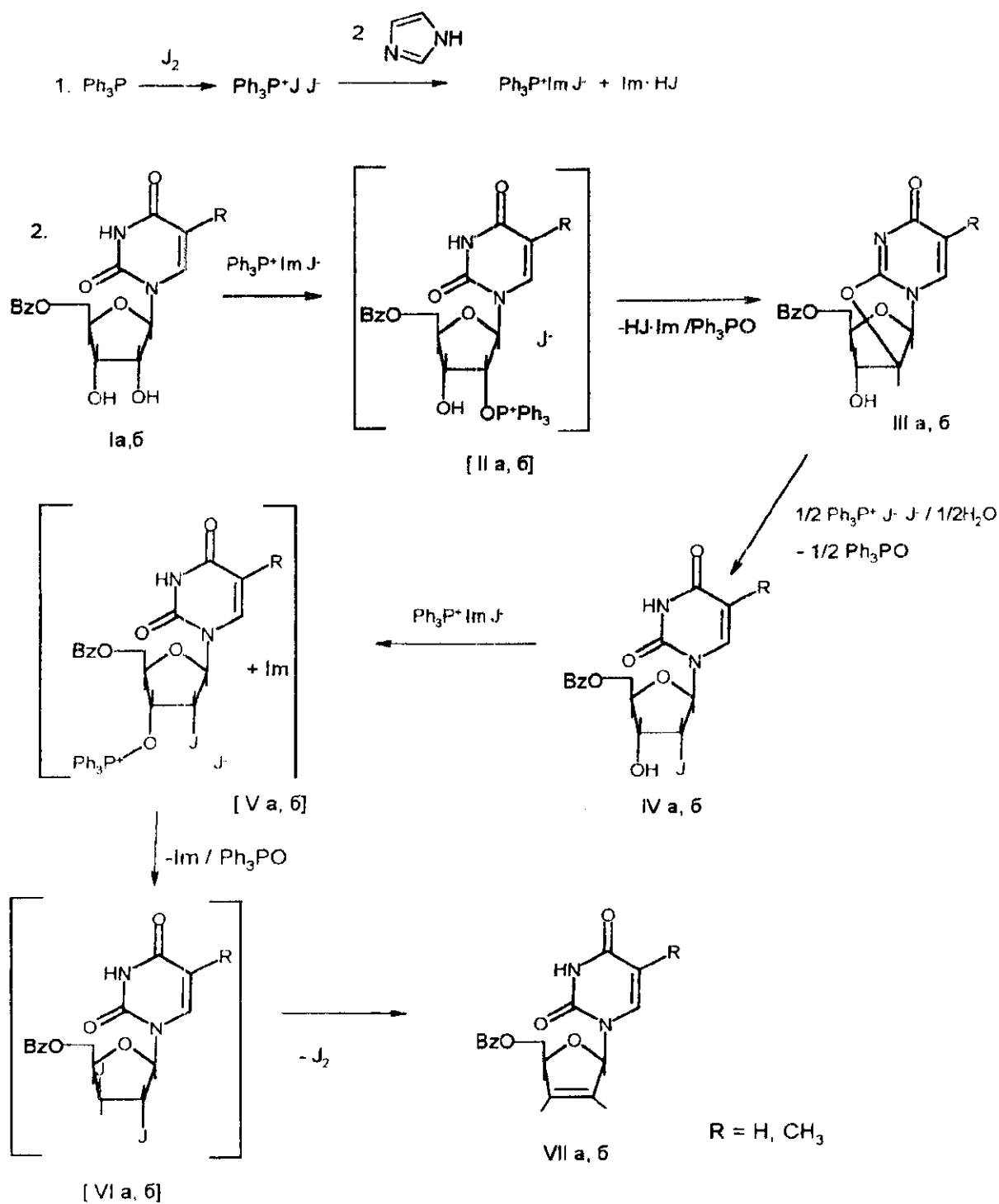
Выходы 5'-О-защищенных О₂,2'-циклонуклеозидов (IIIa—г) приведены в таблице.

Получение 5'-О-бензоил-2'-йод-2'-дезоксипроизводных уридина (IVa) и тиминрибозиды (IVб). К суспензии $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$, полученной при смешивании 1,5—1,7 ммоль Ph_3P и 1,5—1,7 ммоль йода в 20 мл сухого диоксана, добавили раствор 1 ммоль 5'-О-бензоилпроизводного (Ia или Iб) и 3,5—3,7 ммоль имидазола в 10 мл сухого ацетонитрила. Реакционную смесь выдержали в течение 2—4 ч при 35—50 °С, затем отогнали в вакууме ацетонитрил. Остаток растворили в 20 мл сухого диоксана и добавили 0,6—0,8 ммоль Ph_3P , 0,6—0,8 ммоль йода, а через 15 мин — 1 мл диоксана, содержащего 0,5 ммоль воды.

После полного превращения О₂,2'-циклонуклеозидов (IIIa, б) в 2'-йодпроизводные (IVa, б) (контроль ТСХ) реакционную смесь разбавили 10 мл CHCl_3 и 30 мл воды. Водный слой отделили и экстрагировали CHCl_3 (3 × 10 мл). Объединенные органические экстракты высушили над Na_2SO_4 и упарили в вакууме досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле, проводя элюцию сначала CHCl_3 , а затем градиентом CHCl_3 —MeOH (9 : 1).

Выходы 5'-О-бензоил-2'-йод-2'-дезоксипроизводных уридина (IVa) и тиминрибозиды (IVб) приведены в таблице.

Получение 5'-О-бензоил-2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксипроизводных уридина (Va) и тиминрибозиды (Vб). К суспензии $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{J}^-$, полученной при смешивании 1,5—1,7 ммоль Ph_3P и 1,5—1,7 ммоль йода в 20 мл сухого диоксана, добавили раствор 1 ммоль 5'-О-бензоилпроизводного нуклеозида (Ia



Синтезы 5'-О-бензоилзамещенных O₂,2'-цикло- (IIIa, 6), 2'-йод-2'-дезоксид- (IVa, 6) и 2',3'-дигидро-2',3'-дидезокси- (VIIa, 6) производных уридина и тиминрибозиды

Синтезы 5'-О-защищенных 2',О₂-ангидро- (IIIa—в), 2'-йод- (IVa, б) и 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси- (VIIa, б) производных уридина и тиминрибозидов с выделением их на конкретных стадиях реакции Арбузова

Исходный нуклеозид	Конечный нуклеозид на стадии	Соотношение нуклеозид : Ph ₃ P : J ₂ : Im на стадиях			Выход на стадии, %	Т. пл., °С
		I	II	III		
Ia	IIIa	1 : 1,7 : 1,6 : 3,5	—	—	82,3	189—193
Iб	IIIб	1 : 1,6 : 1,5 : 3,2	—	—	92,0	169—172
Iв	IIIв	1 : 1,6 : 1,5 : 3,2	—	—	60,7	217—220
Ia	IVa	1 : 1,7 : 1,6 : 3,5	1 : 0,7 : 0,7	—	80,4	88—89
Iб	IVб	1 : 1,7 : 1,6 : 3,5	1 : 0,7 : 0,7	—	67,0	110—114
Ia	VIIa	1 : 1,7 : 1,6 : 3,5	1 : 0,6 : 0,6	1 : 1,1 : 0,5 : 2,2	82,2	139—140
Iб	VIIб	1 : 1,7 : 1,6 : 3,5	1 : 0,7 : 0,7	1 : 1,1 : 0,5 : 1,7	84,0	160—162

или Iб) и 3,5—3,7 ммоль имидазола в 10 мл сухого ацетонитрила. Реакционную смесь выдержали в течение 6—7 ч при 45—50 °С, затем растворитель упарили в вакууме досуха, остаток соупарили с сухим диоксаном и растворили в 20 мл сухого диоксана. К полученному раствору добавили 0,6 ммоль Ph₃P и 0,6 ммоль йода и через 15 мин 1 мл диоксана, содержащего 0,5 ммоль воды. После полного превращения О₂,2'-циклонуклеозидов (IIIa, б) в 2'-йодпроизводные (IVa, б) (контроль ТСХ) через 1—3 ч при 15—20 °С снова добавили ацетонитрил, молекулярные сита, 1,1 ммоль Ph₃P, 0,5 ммоль йода, а через 30 мин — 1,9 ммоль имидазола. Спустя несколько часов при 15—20 °С реакционную смесь обработали и выделили продукты реакции аналогично вышеприведенным методикам с той лишь разницей, что после разбавления смеси СНСl₃ ее промыли 10 % раствором Na₂S₂O₃ (3 × 10 мл).

Выходы 5'-О-бензоил-2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксипроизводных уридина (Va) и тиминрибозидов (Vб) приведены в таблице.

Результаты и обсуждение. На первом этапе изучения взаимодействия 5'-О-бензоилпроизводных уридина (Ia), тиминрибозидов (Iб) и 5'-О-трифенилпроизводных уридина (Iв) с 1,5—1,7-кратным количеством Ph₃P⁺ImJ⁻, получаемых *in situ*, по данным ТСХ, основными веществами были О₂,2'-циклопроизводные (IIIa—г) и трифенилфосфиноксид Ph₃PO (см. рисунок). Такой исход реакции свидетельствовал об изначальном образовании промежуточных 2'-квазифосфониевых солей [IIIa—в] и о последующей их нуклеофильной внутримолеку-

лярной О₂,2'-циклизации. Стреление выделенных О₂,2'-циклопроизводных (IIIa—г) было доказано на основании данных УФ и ПМР спектров.

В последующих опытах О₂,2'-циклонуклеозиды (IIIa, б) как промежуточные соединения без выделения вводили в реакцию рециклизации по описанной схеме [13]. Таким путем были получены только 5'-О-бензоилзащищенные 2'-йодпроизводные (IVa, б), поскольку для исходного нуклеозидов Iв условия реакции рециклизации неприемлемы из-за нестабильности тритильной защиты при низких значениях pH реакционной среды (см. рисунок).

Опыты по полному йодированию углеводного фрагмента нуклеозидов (Ia, б) проводили аналогично вышеописанным методикам и для последующего 3'-йодирования применяли дополнительные количества Ph₃P⁺ImJ⁻. Все поэтапные реакции в последних опытах контролировали с помощью ТСХ, что и позволило подобрать оптимальные количества и соотношения реагентов. Применение некоторого избытка Ph₃P и йода связано с протеканием побочных реакций и, прежде всего, с гидролизом 3'-квазифосфониевого производного на второй стадии.

Последний этап многостадийного синтеза завершался сравнительно быстрым образованием 2',3'-дидегидронуклеозидов (VIIa, б). При высокой реакционной способности промежуточных С₃-квазифосфониевых солей [Va, б] возможны два пути их последующих превращений. Высокая скорость образования 2',3'-дидегидронуклеозидов (VIIa, б) свидетельствовала о более вероятном механизме, в

основе которого лежит перегруппировка Арбузова. В противном случае при внутримолекулярной $O_2,3'$ -циклизации и дальнейшем расщеплении $O_2,3'$ -циклонуклеозида йодистым водородом это промежуточное соединение можно было обнаружить с помощью ТСХ. Кроме того, при использовании ацетонитрила в качестве растворителя расщепление $O_2,3'$ -циклопроизводного должно проходить крайне медленно вследствие связывания ацетонитрилом йодистого водорода и выведения его из сферы взаимодействия в виде ацетимидойодида.

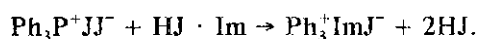
Приняв во внимание направленность реакций образования $2'$ - и $3'$ -квазифосфониевых производных и последующих реакций нуклеофильного замещения по C_2 - и C_3 -атомах фуранозы, следует отметить, что конечными продуктами должны быть только *транс*- $2',3'$ -дийодпроизводные нуклеозидов (Ia, б). Значительная нестабильность дийодпроизводных [VIa, б], как уже отмечалось, стала причиной их дейодирования и превращения в $2',3'$ -дидегидро- $2',3'$ -дидезоксинуклеозиды (VIIa, б).

При взаимодействии эквимольных количеств $5'$ -*O*-бензоилнуклеозида (Ia), Ph_3P , йода и имидазола (1:1:1:2) в сухом растворителе основным продуктом было $O_2,2'$ -циклопроизводное (IIIa). При недостаточном количестве имидазола наблюдалось значительное образование смеси последне-го соединения (IIIa) с $2'$ -йод- (IVa) и дидегидро- (VIIa) производными, что свидетельствовало о параллельном протекании реакций расщепления йодистым водородом циклопроизводного и C_3 -йодирования по схеме реакции Арбузова.

Синтезы $2',3'$ -дидегидронуклеозидов (VIIa, б) без выделения промежуточных соединений проводили с учетом данных об изучении постадийных реакций, подбирая соотношения йодирующих агентов на каждом этапе. Так как исходные $5'$ -*O*-бензоилпроизводные (Ia, б) растворимы только в ацетонитриле, а $Ph_3P^+ImJ^-$ — в диоксане, то первую стадию — $O_2,2'$ -циклизацию и третью — образование C_3 -квазифосфониевых солей (Va, б) и их перегруппировку проводили в смеси этих растворителей.

Как видно из таблицы, при наиболее оптимальном соотношении реагирующих веществ и нагревании до 40—50 °С в течение 6—7 ч наблюдалось полное превращение исходных (Ia, б) в $O_2,2'$ -циклопроизводные (IIIa, б). Было найдено, что обязательное удаление ацетонитрила на последующей второй стадии рециклизации обусловлено тем, что образующийся при гидролизе $Ph_3P^+JJ^-$ йодистый водород полностью связывается ацетонитрилом и тем самым выводится из сферы взаимодействия с $O_2,2'$ -циклонуклеозидом.

Подтверждением того, что йодистый водород выполняет функции йодирующего агента и протонного катализатора, были опыты с поэтапным добавлением Ph_3P , йода и Im в абсолютном растворителе и в присутствии ацетонитрила. При этом $2',3'$ -дидегидронуклеозиды (VIIa, б) образовывались только при значительном избытке йодирующего агента и при подогреве реакционной массы до 40—50 °С. В этом случае необходимое количество йодистого водорода, по-видимому, выделялось при образовании C_3 -квазифосфониевой соли или вследствие следующей реакции:



Аналогичный исход реакции наблюдался при взаимодействии $O_2,2'$ -циклонуклеозидов (IIIa, б) с тройным избытком $Ph_3P^+JJ^-$ в сухом диоксане в присутствии молекулярных сит.

Выводы. При поэтапном изучении йодирования $5'$ -*O*-защищенных пиримидиновых нуклеозидов показано, что механизм реакций полного йодирования C_2 - и C_3 -атомов рибофуранозы включает последовательное образование соответствующих квазифосфониевых солей, которые как промежуточные активные синтоны участвуют в дальнейших внутримолекулярных превращениях и перегруппировках.

Направленность каждой поэтапной реакции предопределяется кинетическими и стерическими свойствами промежуточных квазифосфониевых синтонов. Практическим итогом исследований является разработка оригинальных методов получения $O_2,2'$ -цикло-, $2'$ -йод- и $2',3'$ -дидегидро- $2',3'$ -дидезоксипроизводных уридина и тимидина.

В. Г. Костина, А. С. Шаламай, Л. С. Усенко, В. О. Гладка

Вивчення механізмів йодування $5'$ -*O*-захисених піримідиннуклеозидів в умовах реакції Арбузова

Резюме

Вивчено механізм реакцій йодування C_2 - та C_3 -атомів вуглеводного фрагмента піримідинових нуклеозидів, пов'язаних з поэтапним утворенням проміжних квазифосфонієвих солей і подальшою їхньою трансформацією в умовах внутримолекулярних нуклеофільних реакцій. Показано, що кінцевий продукт $2',3'$ -дийодид як нестабільна сполука зазнає руйнівного дейодування і перетворюється у $2',3'$ -дидегідро- $2',3'$ -дидезоксинуклеозид.

V. G. Kostina, A. S. Shalamay, L. S. Usenko, V. A. Gladkaya

Study of iodination mechanism of $5'$ -*O*-protected pyrimidine nucleosides in Arbusov reaction conditions

Summary

The mechanism of iodination of C_2 - and C_3 -atoms of ribofuranose in pyrimidine nucleosides in conditions of Arbusov reaction have

been studied. Intermediate 2'- and 3'-quaziphosphonium salts were shown to be involved in further intramolecular nucleophilic reactions, the resulting 2',3'-diiododerivative being deiodinated and transformed into correspondent 2',3'-didehydro-2'-3'-dideoxynucleosides.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kravetsky A. A., Watanabe K. A. Modified nucleosides as anti-AIDS drugs: Current status and perspectives.—Moscow, 1993.—С. 212 p.
2. Baba M., Pauwels R., Herdewjen P. et al. Both 2',3'-dideoxythymidine and its 2',3'-unsaturated derivative (2',3'-dideoxythymidine) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication *in vitro* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—142, N 2.—P. 128—134.
3. Bristol-Meyers Squibb Company. Original monography // *Drugs of the Future.*—1996.—21, N 10.—P. 1080—1092.
4. Самуков В. В., Офицеров В. М. Синтез 2',3'-дидезоксинуклеозидов // *Биорг. химия.*—1983.—9, № 1.—С. 56—59.
5. Aerschot A. V., Everaert D., Balarini J. et al. Synthesis and anti-HIV evaluation of 2',3'-dideoxyribo-5-chloropyrimidine analogues: reduced toxicity of chlorinated 2',3'-dideoxynucleosides // *J. Med. Chem.*—1990.—33, N 11.—P. 1833—1839.
6. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G. Iodination of secondary hydroxyl groups of nucleosides with methyltriphenoxyphosphonium iodide // *J. Org. Chem.*—1970.—35, N 9.—P. 2868—2877.
7. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G. Reactions for the chlorination and bromination of nucleoside hydroxyl groups // *Ibid.*—1972.—37, N 14.—P. 2289—2292.
8. Codington J. F., Doerr J. L., Fox J. J. Synthesis of 2'-fluorothymidine, 2'-fluorodeoxyuridine and other 2'-halogeno-2'-deoxynucleosides // *Ibid.*—1969.—29, N 3.—P. 558—569.
9. Garegg P. J., Samuelsson B. Conversion of vicinal diol into olefins using triphenylphosphine and triiodimidazole // *Synthesis.*—1979.—N 3.—P. 469.
10. Garegg P. J., Samuelsson B. Novel reagent system for converting a hydroxy-group into an iodo-group in carbohydrates with inversion of configuration // *Ibid.*—N 4.—P. 813—814.
11. Garegg P. J., Samuelsson B. Novel reagent system for converting a hydroxy-group into an iodo-group in carbohydrates with inversion of configuration // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*—1980.—N 12.—P. 2866—2868.
12. Костина В. Г., Шаламай А. С., Усенко Л. С. Синтез 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиуридина с участием трифенилфосфониевых йодидов // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 4.—С. 100—106.
13. Костина В. Г., Шаламай А. С., Усенко Л. С., Гладкая В. А. Рециклизация O₂,2'-циклопиримидиннуклеозидов с использованием галоидпроизводных трехвалентного фосфора и квазифосфониевых солей // *Там же.*—1997.—13, № 3.—С. 197—201.
14. Framadeot H. P. M., Griffin B. E., Reese C. B., Sulston J. E. Monoacylation of ribonucleosides and derivatives via conversion of orthoformate // *Tetrahedron.*—1967.—23, N 20.—P. 2315—2319.

Поступила в редакцию 07.04.98