



Title	免疫抑制剤の研究(第1報) : 2',5'-ジアザ葉酸の合成
Author(s)	中原, 雄二; 関川, 勲; 柿本, 七郎
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 8-12
Issue Date	1976-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26496
Type	bulletin (article)
File Information	36_P8-12.pdf



[Instructions for use](#)

免疫抑制剤の研究 (第1報)

2', 5'-ジアザ葉酸の合成

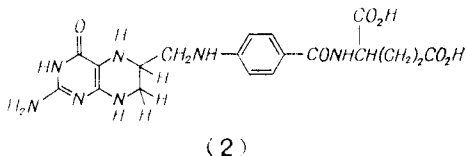
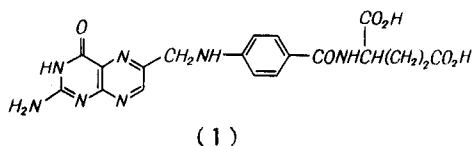
中原雄二 関川 勲 柿本七郎

(北海道大学免疫科学研究所 化学部門)

(昭和50年10月31日受付)

緒 言

葉酸(1)は、生体内で還元されて、テトラヒドロ葉酸(FH₄)(2)となり、1分子のギ酸と結合して種々の誘導体となる。これらの誘導体は核酸の構成成分であるプリン



核・ピリミジン核の生合成の際に、ギ酸を運搬するための補酵素として作用する¹⁾(**図 I**)。したがって葉酸の拮抗物質は、ヌクレオチドの生合成を阻害することにより DNA の合成を阻害し、ガン細胞など DNA 合成のさかんな細胞の成長を阻止することが、考えられる。テトラヒドロ葉酸がギ酸と結合する部分は、10位の窒素であるから、葉酸のN¹⁰の電子密度を下げるとギ酸と縮合する能力が減少し、逆にN¹⁰の電子密度を上げると、ギ酸と縮合して出来た誘導体が安定化され、基質へのギ酸の運

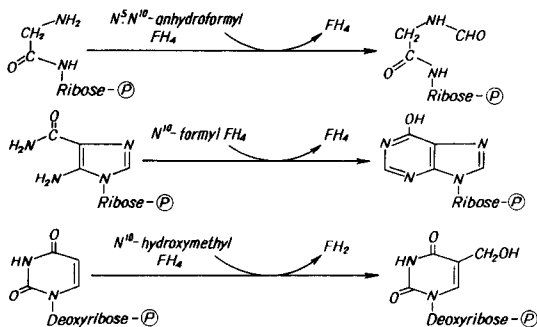


図 I

搬が阻害されることになる。このように、N¹⁰の電子密度を変化させることによって、抗葉酸物質が得られると考えることができる。この考えに従って Roberts と Shealy は葉酸のベンゼン核をピリジン核、チアゾール核、及びピリミジン核に変えて、N¹⁰の電子密度を下げた同族体を合成した²⁾。しかし、これらの化合物は、現在良く知られている抗葉酸物質のアミノプテリン、アミノプテリンよりも活性が低かった。著者等も、彼等と同様に、N¹⁰の電子密度を下げる目的でベンゼン核をピラジン核に変えた同族体の合成を行なった。

方 法

目的の2', 5'-ジアザ葉酸(16)は、Roberts と Shealy の合成法と同様に、別途合成した2-アミノ-5-ピラジンカルボン酸(7)³⁾、2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-ホルミルプテリジン(13)⁴⁾とグルタミン酸ジエチルエステル塩酸塩とを縮合することによって得た。

2-アミノ-5-ピラジンカルボン酸(7)は、**図 II**に従って合成した。これは既知の方法であるが、脱炭酸のところでは、従来の方法では収量が少なかったので、キノリン中において銅粉とガラス粉を用いて、高収率を上げることが出来た。

2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-ホルミルプテリジン(13)⁴⁾は、Sletzinger et al. の方法により**図 III**に従って合成した。この場合、中間体となる(10)は、単離することなく、そのまま次の段階の反応に用いた。又、(9)と臭素との付加物は、種々の脱臭化水素操作を行なって見たが、どれも良い結果が得られず、不純物の多量に含まれたものしか得られなかった。これは、脱離反応だけでなく、置換反応なども起こるためと考えられる。この結果、最終産物の収量が著しく減少することとなった。

最後に、それぞれの部分の縮合方法を**図 IV**に示す。グルタミン酸ジエチルエステル塩酸塩と(7)との縮合は、最初に DCC を用いて行なった。この場合に得られた化合物は δ 値 0.50~2.00 ppm に 22 個分の水素を有する(7)

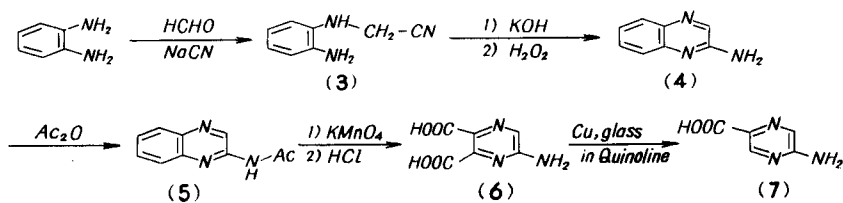


図 II

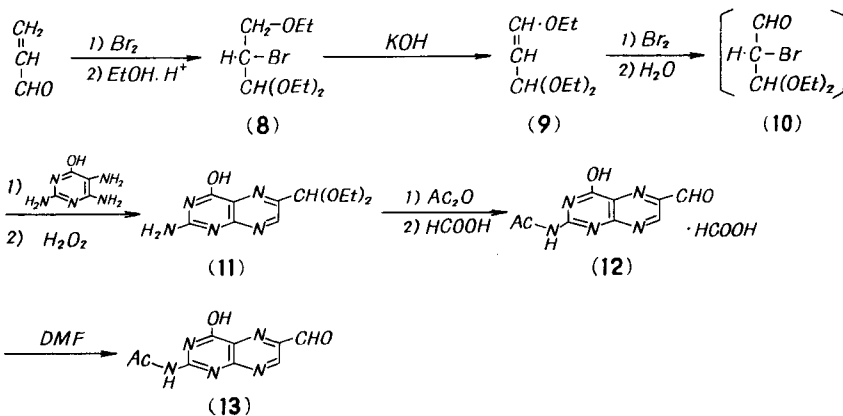


図 III

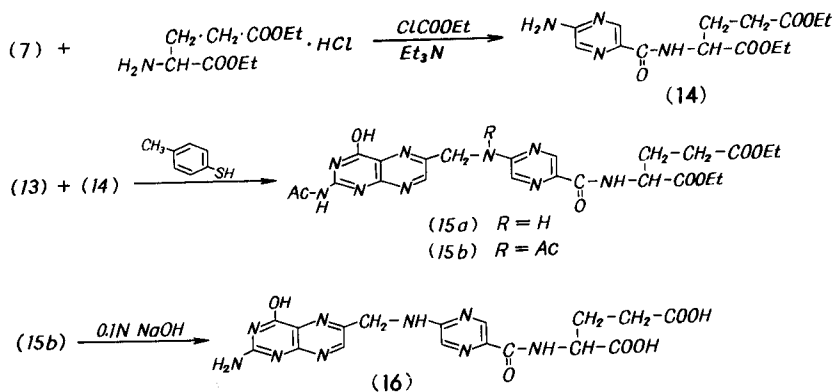


図 IV

と DCC との付加物で、(14) は得られなかった。そこでクロル蟻酸エチルとトリエチルアミンとを用い、DMF 中で攪拌することにより(14)を得た。粗生成物はシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、ベンゼンから再結晶した。

(13) と (14) とは、p-トルエンチオールを含んだ 2-メトキシメタノール中で還流することによって還元的に縮合し(15a)を与えた。(15a)は、無水酢酸と還流することによってアセチル化され(15b)となる。これを、アルミナクロマトグラフィーによって精製し、アセトンから再結

晶した。

精製した(15b)を 0.1N 水酸化ナトリウムで加水分解することにより、目的の 2', 5'-ジアザ葉酸(16)を得た。化合物(14)、(15b)と(16)の生物活性については、現在検討中である。

実験部

赤外スペクトルは島津分光光度計 IR-27G 型、核磁気共鳴スペクトルは日立 R-20B 型により測定し、NMR スペクトルデータはテトラメチルシランを内部標準とす

る δ 値で示した。

N-シアノメチル-o-フェニレンジアミン (3); o-フェニレンジアミン 54 g を 48.6 cc のメタノールにとかし、48.6 ml の濃塩酸を滴下する。この場合、温度を 30°C 以下に保つ。この溶液中に、29.4 g のシアソーダを 70 ml の水に溶かしたものを温度を 30°C 以下に保ちながら 25 分間で加える。次に濃塩酸によって反応液の pH を 6.5 にし、43~45°C に加熱した後、その温度を保ちながらホルムアルデヒド 42 g を 30 分間で加え、更に 1 時間その温度で攪拌後水冷し、結晶を濾取する。収量 61.2 g (83.3%)。この結晶を水から再結晶する。融点 95.8~102°C, IR: 3420, 3340 cm^{-1} (-NH₂), 2260 cm^{-1} (-C≡N); NMR (DMSO-d₆): δ 6.57 (S, 4, phenyl-H), 5.17 (t, 1, NH, J=7 Hz), 4.45 (broad S, 2, -NH₂), 4.18 (d, 2, CH₂, J=7 Hz)。

2-アミノキノキサリン (4); 2.8 g の水酸化カリウムを 120 ml のメタノールに溶かし、35~40°C で、13.3 g の N-シアノメチル-o-フェニレンジアミン (3) を加え攪拌する。反応は窒素気流中で行ない、20 時間後に温度を 30°C に下げ、これに 0.14 g の粉碎した硫酸第一鉄を加え、10 ml の 30% 過酸化水素を 3.5 時間で滴下する。滴下終了後、0.1 g の亜硫酸水素ナトリウムを加えて過剰の過酸化水素を分解し、ノーリット 0.6 g を加えて濾過する。濾液を濃縮乾固し、60 ml の水を加え 1 時間室温に置いた後、結晶を濾取する。収量 8.2 g (62.9%), 融点 151~154°C, NMR (CD₃COCD₃): δ 8.35 (S, 1, C₃-H), 7.15~7.90 (m, 4, phenyl-H), 6.30 (broad S, 2, NH₂)。

2-アセチルアミノキノキサリン (5); 2.9 g の 2-アミノキノキサリンを 40 ml の無水酢酸中で 100°C に 4 時間加熱する。反応終了後水冷し、結晶を濾取して、冷無水酢酸、冷ベンゼンで洗う。収量 2.3 g (60.5%), 融点 188~190.5°C, IR: 1700 cm^{-1} (C=O); NMR (DMSO-d₆) δ 11.04 (broad S, 1, NH), 9.63 (S, 1, C₃-H), 7.50-8.15 (m, 4, phenyl-H), 2.23 (S, 3, CH₃)。

2-アミノ-5,6-ピラジンジカルボン酸 (6); 12.8 g の 2-アセチルアミノキノキサリン (5) を 400 ml の水に入れ、90~95°C に加熱攪拌する。この溶液中に、66 g の過マンガン酸カリウムを 1 l の熱水に溶かしたものを 30 分間で滴下する。反応液を冷却後濾過し、濾液を 60 ml まで濃縮する。この際、生じた沈澱を濾過する。濾液を約 28 ml の濃塩酸で酸性にし、生じた白色沈澱を濾取する。この沈澱を乾燥し、沈澱 1 g に対して 1 N 塩酸 5 ml の割合で加え、40 分間還流する。冷却後、茶色の結晶を得る。収量 2.5 g (27.3%), 融点 250°C 以上, IR: 1700 cm^{-1} (C=O); NMR (DMSO-d₆), δ 7.92 (S, 1, C₃-H),

7.32 (broad S, 3, -N+H₃), 5.50-8.00 (broad, 3, H₃O⁺)。

2-アミノ-5-ピラジンジカルボン酸 (7); 3 g の 2-アミノ-5,6-ピラジンジカルボン酸 (6) と 100 mg の銅粉と 200 mg のガラス粉とを混ぜ、8 ml のキノリンを加えて 180°C に 30 分間加熱する。放冷後、エーテルを加えて沈澱を析出させ、濾過する。

得られた沈澱を 500 ml の水より、再結晶する。収量 1.55 g (68.4%), 融点 274°C 分解, IR: 1700 cm^{-1} (C=O); NMR (DMSO-d₆) δ 8.51 (d, 1, C₆-H, J=1.5 Hz), 7.88 (d, 1, C₃-H, J=1.5 Hz) 7.15 (broad S, 3, -N+H₃)。

2-ブロモ-1,1,3-トリエトキシプロパン (8); 100 g のアクロレインを 300 ml のエーテルに溶かし、0°C で 290 g の臭素を、1.5 時間かけて滴下する。滴下終了後、室温でエーテルを留去し、残渣に、5.4 g の塩化水素を含む 600 ml の無水エタノールを加え 6 時間還流する。反応液に 200 ml のベンゼンを加え、反応液中の水を共沸によって除く。冷却後炭酸水素ナトリウムを加えてアルカリ性にする。沈澱を濾別し、濾液を減圧蒸留する。収量 236 g (48.1%), 沸点 105°C (16 mmHg), 114.5°C (13.5 mmHg), IR: 1060, 1115 cm^{-1} , (acetal); NMR (CDCl₃), δ 4.66 (d, 1, C₁-H, J=5.0 Hz), 3.36-4.25 (m, 9, C₂-H, C₃-H, -o-CH₂), 1.23 (t, 9, CH₃, J=7.0 Hz)。

1,3,3-トリエトキシプロパン (9); 35 g の水酸化カリウムを 120 ml の無水エタノールに溶かし、52 g の 2-ブロモ-1,1,3-トリエトキシプロパン (8) を入れ、窒素気流中で還流する。3 時間後に還流を止め、沈澱を濾過し濾液から溶媒を留去する。残渣に 100 ml の水を加え、有機層を分離する。水層を 50 ml ずつのエーテルで 3 回抽出し、先の有機層と合わせて減圧蒸留する。沸点 92°C (18 mmHg)~99°C (15 mmHg) の溜分を集める。収量 26 g, IR: 1660 cm^{-1} (C=C) 1055, 1110 cm^{-1} (acetal)。

2-アミノ-4-ヒドロキシ-6-ジエトキシメチルプテリジン (11); 70 ml のエーテルに、17 g の 1,3,3-トリエトキシプロパン (9) を溶かし、0°C で 9 g の臭素を滴下する。室温でエーテルを留去し、残渣を 50 ml の水と 12.5 ml のアセトンとの混合液中に滴下し、0°C で 1 日間攪拌する。反応液をクロロフォルムで抽出し、溶媒を留去する。

17 g の炭酸水素ナトリウムを 140 ml の水に溶かし、12 g の 2,4,5-トリアミノ-6-ヒドロキシピリミジン硫酸塩を加え炭酸ガスの発生が止んだ後に、先の残渣を室温で滴下する。2 時間室温で攪拌した後、36 ml の 10% 過酸化水素水を滴下し、1.5 時間後さらに 18 ml の 10% 過酸化水素水を滴下して攪拌を続ける。24 時間後反応液から沈澱を濾取し、これを 150 ml の 0.4 N 水酸化ナトリ

ウムに溶かして不溶物を濾別し、濾液の中へ18gの水酸化ナトリウム粒を入れて、生成物のナトリウム塩を結晶させる。この結晶を120mlの水に溶かし、36%酢酸を用いてpH3とする。生成した結晶を濾取する。収量2.6g(19.6%, 2,4,5-トリアミノ-6-ヒドロキシピリミジンより), IR: 1060, 1105 cm^{-1} (acetal); NMR (DMSO- d_6 , ナトリウム塩として測定), δ 8.53 (S, 1, C₇-H), 6.44 (broad S, 2, NH₂), 5.4 g (S, 1, C₉-H), 3.57 と 3.59 (q, 2, -OCH₂, J=7.5 Hz), 1.15 (t, 3, CH₃, J=7.5 Hz)。

2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-フォルミルプテリジン(13); 7mlの無水酢酸中に、2-アミノ-4-ヒドロキシ-6-ジエトキシメチルプテリジン(11)1gを入れ、100°Cに4時間加熱する。反応溶液を熱濾過し、濾液を冷却して結晶を濾取し、冷無水酢酸、冷ベンゼンで洗う。10mlエタノールから再結晶することにより、667mgの結晶を得る。この結晶を3mlのギ酸に溶かし、室温で攪拌する。2~3分後に白色結晶が現われるが、そのまま2時間攪拌し、さらに3時間5°Cに静置する。白色結晶を濾過し、冷ギ酸・冷エーテルで洗う。540mgの2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-フォルミルプテリジンモノフォルメイト(12)が得られる。この結晶を5mlのDMFから再結晶すると、ギ酸が取れて、2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-フォルミルプテリジン(13)となる。IR: 1709 cm^{-1} (CHO), 1690 cm^{-1} (amide); NMR (DMSO- d_6), δ 11.90-12.54 (broad, 2, NH, OH), 10.07 (S, 1, -CHO), 9.26 (S, 1, C₇-H), 2.25 (S, 3, CH₃)。

ジエチル N-[(2-アミノ-5-ピラジニル)カルボニール]グルタメイト(14); 6gの2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-フォルミルプテリジン(11)を150mlの無水DMFに懸濁し、0°Cで13.1gのトリエチルアミンと4.7gのエチルクロロフォルメイトを加え1時間室温で攪拌する。10.3gのジエチルグルタメイト・塩酸塩を滴下し、さらに室温で3日間攪拌する。反応液より沈澱を濾過し、濾液より溶媒を留去する。残渣を130mlの酢酸エチルに溶かし、1M炭酸ナトリウム溶液、水で洗い乾燥する。この溶液より溶媒を留去し、200gのシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、クロロフォルム-メタノール(96:4)で展開する。生成物を含んだフラクションを集め、溶媒を留去し、ベンゼンより再結晶する。収量3.4g(25%), 融点114.5°C, IR: 1740 cm^{-1} (COOC₂H₅), 1650 cm^{-1} (CONH); NMR (CDCl₃), δ 8.65 (broad S, 1, C₆-H), 7.99 (d, 1, CONH, J=9.0 Hz), 7.83 (broad S, 1, C₃-H), 5.20-5.90 (broad S, 2, NH₂), 4.52-5.05 (m, 1, NCH), 4.23 (q, 2, OCH₂, J=7.0 Hz), 4.11 (q, 2, OCH₂, J=7.0 Hz), 2.00-2.70 (m, 4, CH₂CH₂), 1.29 (t, 3, CH₃,

J=7.0 Hz), 1.22 (t, 3, CH₃, J=7.0 Hz)。分析値: C, 51.66; H, 6.17; N, 17.23%, C₁₄H₂₀N₄O₅ としての計算値: C, 51.84; H, 6.22; N, 17.28%。

ジエチル N-[5-(2-[(2-アセトアミド-4-ヒドロキシ-6-プテリジニル)メチル]アセチルアミノ)ピラジニル)カルボニール]グルタメイト(15b); 2.6gの(14)と5.95gのp-トルエンチオールを140mlの2-メトキシエタノール中で加熱する。反応液が還流を始めたころ、フラスコの中にアルゴンガスを満たし、1.86gの(13)を加えて1日間還流を続ける。反応液を冷却した後、灰黒色の沈澱を濾過し、エーテルで洗う。濾液を濃縮してエーテルで処理し、さらに沈澱を得る。これらの沈澱を無水酢酸中で5時間還流する。反応液を熱濾過し、濾液を濃縮してエーテルで処理することにより結晶を得る。この結晶を80gのアルミナカラムクロマトグラフィーでクロロフォルム-メタノール(95:5)によって展開し、生成物を含んだフラクションを集め溶媒を留去してアセトンから再結晶する。収量227mg(4.9%), 融点200-201.5°C, IR: 1730 cm^{-1} (COOC₂H₅), 1690 (CONH); NMR (CDCl₃), δ 10.60-11.70 (broad, 2, OH, NH), 9.11 (S, 2, C₆'-H, C₇-H), 8.96 (S, 1, C₃'-H), 8.25 (d, 1, CONH, J=9.0 Hz), 5.41 (broad S, 2, NCH₂), 4.60-4.95 (m, 1, NCH), 4.21 (q, 2, OCH₂, J=7.5 Hz), 4.08 (q, 2, OCH₂, J=7.5 Hz), 2.41 (S, 3, COCH₃), 2.37 (S, 3, COCH₃), 2.20-2.55 (m, 4, CH₂CH₂), 1.27 (t, 3, CH₃, J=7.5 Hz), 1.18 (t, 3, CH₃, J=7.5 Hz)。分析値: C, 51.43; H, 4.93; N, 21.54%, C₂₅H₂₉N₉O₈ としての計算値: C, 51.45; H, 5.00; N, 21.60%。

N-[5-(2-[(2-アミノ-4-ヒドロキシ-6-プテリジニール)メチル]アミノ)ピラジニル)カルボニール]グルタミン酸(16); 45mgの(15b)を30mlの空気を抜いた0.1N水酸化ナトリウムに溶かし、アルゴン気流中室温で攪拌する。16時間後、反応液を1N塩酸でpH3.5とし、遠心分離によりゲル状の生成物を集める。このゲル状の生成物を0.005N塩酸で遠心により5回洗い、減圧下に乾燥する。収量32mg(94%), 融点206°C分解, IR: 1715 cm^{-1} (COOH), 1675 cm^{-1} (CONH); NMR (0.5N NaOD), δ 8.48 (S, 1, C₇-H), 8.20-8.35 (broad, 1, C₆-H), 7.75-8.04 (broad, 1, C₃'-H), 4.20-4.65 (broad, 2, C₉-H), 1.95-2.60 (m, 4, CH₂CH₂)。分析値: C, 43.21; H, 4.13; N, 26.44%, C₁₇H₁₇N₉O₆·1.5H₂O としての計算値: C, 43.41; H, 4.29; N, 26.80%。

文 献

- 1) M. Friedkin: Annu. Rev. Biochem., 32, 185

- (1963).
- 2) E. C. Roberts and Y. F. Shealy: J. Med. Chem., **14**, 125 (1971); **15**, 1310 (1972); J. Heterocycl. Chem., **11**, 547 (1974).
- 3) K. Pfister, A. P. Sullivan, J. Weiyard and M. Tishler: J. Amer. Chem. Soc., **73**, 4955 (1951); E. Felder, D. Pitré and E. B. Grabitz: *Herv. Chim. Acta.*, **47**, 873 (1964).
- 4) M. Sletzing, D. Reinhold, J. Grier, M. Beachem and M. Tishler: J. Amer. Chem. Soc., **77**, 6365 (1955); J. N. Wells and M. S. Strahl: J. Pharm. Sci., **61**, 533 (1971).

Synthesis of N-[5-(2-[(2-Amino-4-hydroxy-6-pteridiny)-methyl] amino) pyrazinyl) carbonyl]-L-glutamic Acid
(2', 5'-Diazafolic Acid)

Yu-uji NAKAHARA, Isao SEKIKAWA and Shichiro KAKIMOTO

2', 5'-Diazafolic acid (16) was synthesized by the condensation of 2-acetylamino-4-hydroxy-6-formylpteridine (13) with diethyl N-[(2-amino-5-pyrazinyl) carbonyl]-L-glutamate (14) followed by acetylation of N¹⁰ and alkaline hydrolysis of the protecting groups. Intermediate (14) was prepared by the condensation of diethyl L-glutamate with 2-amino-5-pyrazinecarboxylic acid using ethyl chloroformate.