

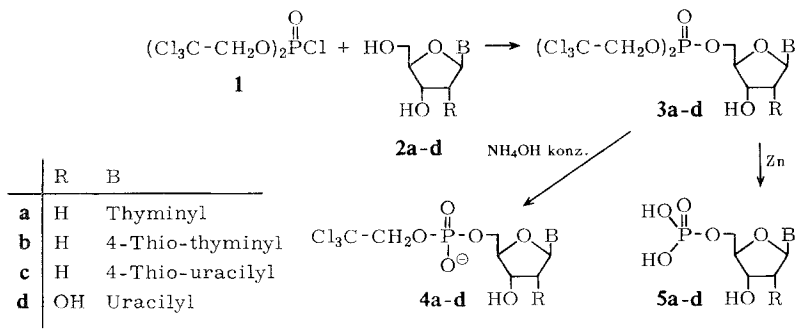
Albrecht Franke, Karl-Heinz Scheit¹⁾ und Fritz Eckstein

Selektive Phosphorylierung von Nucleosiden

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
(Eingegangen am 22. März 1968)

Phosphorsäure-bis-[β . β . β -trichlor-äthylester]-chlorid eignet sich zur selektiven Phosphorylierung von Nucleosiden in 5'-Stellung. Die entstehenden Nucleosid-5'-bis-[β . β . β -trichlor-äthyl]-phosphate lassen sich in Ausbeuten von 40–70% isolieren. Die Triester werden durch Behandeln mit Zinkstaub in Nucleosid-5'-phosphate übergeführt.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß sich Phosphorsäure-bis-[β . β . β -trichlor-äthylester]-chlorid (**1**) hervorragend zur Phosphorylierung von geschützten Nucleosiden eignet²⁾. Die dabei entstehenden Nucleosid-phosphorsäure-bis-[β . β . β -trichlor-äthylester] lassen sich leicht und in guter Ausbeute, meist in kristalliner Form, isolieren. Diese Triester werden durch Behandlung mit Cu/Zn in Dimethylformamid oder Zn-Staub in 80proz. Essigsäure zu Nucleosidphosphaten gespalten³⁾. Es war anzunehmen, daß **1** auf Grund der beiden raumbeanspruchenden Trichloräthylgruppen eine gewisse Selektivität bei der Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside besitzen sollte. Bei der Reaktion von äquiv. Mengen **1** mit Desoxythymidin beobachteten wir tatsächlich nur ein Reaktionsprodukt. Die Analyse der kristallinen Verbindung ergab, daß es sich um Desoxythymidin-phosphorsäure-bis-[β . β . β -trichlor-äthylester] handelte. Den Nachweis dafür, ob Substitution in 5'- oder 3'-Stellung erfolgte, führten wir auf folgende Weise. Der Triester wurde durch Behandeln mit konz. wäßrigem Ammoniak unter Abspaltung einer Trichloräthylgruppe in Desoxythymidin-phosphorsäure-[β . β . β -trichlor-äthylester] übergeführt. Da dieser Diester von



¹⁾ Anfragen können an diesen Autor gerichtet werden.

²⁾ F. Eckstein und K.-H. Scheit, *Angew. Chem.* **79**, 317 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* **6**, 362 (1967).

³⁾ F. Eckstein, *Chem. Ber.* **100**, 2228 (1967).

Schlängengift-Phosphodiesterase quantitativ zu Desoxythymidin-5'-phosphat gespalten wurde, muß die Phosphorylierung von Desoxythymidin durch **1** ausschließlich in 5'-Stellung erfolgt sein.

Kurzes Kochen von **3a** in wäßrigem Pyridin mit Zn-Staub führte zu Desoxythymidin-5'-phosphat (**5a**), welches papierchromatographisch mit authentischer Substanz identisch war. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei der Phosphorylierung von Desoxy-4-thio-thymidin (**2b**), Desoxy-4-thio-uridin (**2c**) und Uridin (**2d**). Die entsprechenden Triester wurden in Ausbeuten von 75–42% durch Umkristallisation des Rohproduktes erhalten. Der Triester **3d** wurde in amorpher Form durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel isoliert. Bei der Anwendung eines Überschusses an Phosphorylierungsreagens **1** beobachteten wir die Bildung von Disubstitutionsprodukten.

Die Vorteile dieser Phosphorylierungsmethode scheinen uns diese zu sein:

1) Zur Darstellung von Nucleosid-5'-phosphaten ist es nicht mehr erforderlich, geschützte Nucleoside mit freier 5'-OH-Gruppe zu bereiten. (Vgl. auch l. c.^{4,5}.)

2) Die Stabilität der Triester erlaubt es, die Phosphorylierungsprodukte leicht und in großer Reinheit abzutrennen.

3) Die Abspaltung der Trichloräthylgruppen durch Zinkstaub in Pyridin erfolgt unter milden Bedingungen zu 90–95%. Die gebildeten Nucleotide können durch präparative Dünnschichtchromatographie in großer Reinheit, frei von Phosphorsäure, isoliert werden.

4) Diese Methode kann auch zur Phosphorylierung großer Mengen Nucleoside benutzt werden.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Bemerkungen: Pyridin wurde über Calciumhydrid getrocknet und destilliert. UV-Spektren wurden mit den Geräten PMQ II und Cary 14 gemessen. Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Reichert, Österreich) bestimmt und sind nicht korrigiert.

Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen); Lösungsmittel Äthanol/*m* CH₃CO₂NH₄ = 5 : 2 (A) bzw. 2*n* HCl/*n*-Propanol = 1 : 3 (B).

Dünnschichtchromatographie: Für analytische Zwecke wurden Silicagel-Dünnschichtplatten F₂₅₄ (Merck AG), für präparative Trennungen Silicagel PF₂₅₄ (Merck AG) verwendet. Lösungsmittel Chloroform/Methanol = 95 : 5 (C) bzw. Chloroform/Methanol = 7 : 3 (D) bzw. Propanol-(2)/NH₄OH_{konz.}/H₂O = 7 : 1 : 2 (E).

Darstellung der Nucleosid-5'-bis-[β,β,β-trichlor-äthyl]-phosphate: 1 mMol Nucleosid wurde durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin getrocknet, zum Rückstand wurde in 5 ccm Pyridin 1.2 mMol Phosphorsäure-bis-[β,β,β-trichlor-äthylester]-chlorid (**1**) unter Kühlung gegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 Std. bei 3° aufbewahrt und anschließend zur Trockne eingengt. Den Rückstand löste man in 50 ccm Chloroform und extrahierte mit 4mal 25 ccm Wasser. Die Chloroformphase wurde eingengt, der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert oder das amorphe Produkt durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in Lösungsmittel C isoliert.

⁴) M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 5065.

⁵) M. Honjo, T. Masuda, K. Imai und S. J. Fujii, VII. Biochemischer Kongreß, Tokyo 1967, Abstract IV, 620.

Tab. 1. Darstellung von Nucleosid-5'-bis-[β,β,β-trichlor-äthyl]-phosphaten

Synthese- produkt	Ansatz	Ausb.	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse C H N P S	UV-Spektrum (in Methanol)
3a	1.0 mMol 2a (250 mg)	450 mg ≧75%	139°	$C_{14}H_{17}Cl_6N_2O_8P$ (585.0)	Ber. 28.87 2.92 4.81 5.33 — Gef. 28.99 3.73 4.85 5.11 —	λ_{max} 265 m μ , ε 9100; λ_{min} 232 m μ , ε 2600
	1.2 mMol 1 (450 mg)					
3b	1 mMol 2b (450 mg)	370 mg ≧60.5%	158—159°	$C_{14}H_{17}Cl_6N_2O_7PS$ (601.1)	Ber. 28.09 2.84 4.68 5.18 5.35 Gef. 28.06 3.02 4.71 5.20 5.45	λ_{max} 323 m μ , ε 20500; λ_{max} 236 m μ , ε 5000; λ_{min} 273 m μ , ε 2080; λ_{min} 222 m μ , ε 4040
	1.2 mMol 1 (450 mg)					
3c	1.5 mMol 2c (360 mg)	370 mg ≧42%	150—151°	$C_{13}H_{15}Cl_6N_2O_7PS$ (587.1)	Ber. 26.71 2.57 4.79 5.31 5.48 Gef. 26.92 2.56 4.70 5.17 5.32	λ_{max} 330 m μ , ε 18400; λ_{max} 249 m μ , ε 5950; λ_{min} 280 m μ , ε 2500; λ_{min} 225 m μ , ε 3150
	1.8 mMol 1 (685 mg)					
3d	1 mMol 2d (244 mg)	1.10 g ≧45.5%	amorph	$C_{13}H_{15}Cl_6N_2O_9P$ (587.0)	Ber. 26.80 2.57 4.80 5.32 — Gef. 26.87 2.77 4.64 5.15 —	λ_{max} 260 m μ , ε 9900; λ_{min} 229 m μ , ε 3100
	1.2 mMol 1 (450 mg)					

Tab. 2. R_F -Werte

Substanz	Lösungsmittel-System				E
	A	B	C	D	
2a			0.14		
2b			0.22		
2c			0.09		
2d			0		
4a	0.75			0.15	0.76
4b	0.87			0.27	0.66
4c	0.79			0.22	
4d	0.76			0.05	0.53
3a			0.35		
3b			0.51		
3c			0.23		
3d			0.10		
5a	0.26	0.78			0.23
Desoxythymidin- 3'-phosphat		0.86			
5b	0.35	0.77			0.24
Desoxy-4-thio- thymidin-3'-phosphat		0.86			
5c	0.26				
5d	0.14	0.55			0.11
Uridin-3'-phosphat		0.66			

Spaltung der Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$ zu den Nucleosid-5'- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphaten}$: 0.1 mMol *Triester* wurde in 5 ccm *Pyridin*/ $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz.}}$ (1:1) gelöst. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wurde eingengt und der *Diester* durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel D isoliert.

Spaltung der Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$ zu Nucleosid-5'-phosphaten: 0.1 mMol *Triester* wurde in 3 ccm *Pyridin*/Wasser (9:1) mit 50—100 mg *Zinkstaub* 5 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach Abzentrifugieren des *Zinkstaubes* wurden die Zn^{++} -Kationen durch Filtrieren der Lösung über Ionenaustauscher (H^+ , Merck) entfernt. Das Filtrat wurde eingengt und das *Nucleotid* durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silicagel in Propanol-(2)/0.5 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat (9:2) isoliert.

Enzymatische Hydrolyse der Nucleosid-5'- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$ durch Schlangengift-Phosphodiesterase: 1 μMol *Diester* wurde in 0.2 ccm 0.1 *m* Tris-Puffer pH 8 mit 10 μg *Enzym* (E. C. 3.1.4.1, Fa. Böhringer, Mannheim) 10 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Hydrolysat wurde papierchromatographisch im Lösungsmittel A getrennt.

[119/68]