

Gotthard Kowollik und Peter Langen

Ein neuer Weg zu 3'-Desoxy-uridin aus Uridin

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

(Eingegangen am 8. Juli 1967)

Die Darstellung von 3'-Desoxy-uridin (3) aus Uridin über 1 und 2 wird beschrieben. 3 ist gegenüber saurer Hydrolyse relativ stabil. 3 hemmt in vitro weder die DNS- noch die RNS-Synthese von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Die Verbindung vermag Nucleosid-Phosphorylasen nicht zu hemmen und wird durch diese Enzyme nicht gespalten.

Es ist bekannt, daß 3'-Desoxy-adenosin durch Einbau in die DNS¹⁾ und RNS¹⁻³⁾ sowie durch die Senkung des Pools an Ribonucleotiden^{4, 6)} infolge Hemmung der 5-Phosphoribosylpyrophosphat-Bildung⁷⁾ cytostatisch wirkt. Wir haben daher das 3'-Desoxy-ribosid des Uracils (3'-Desoxy-uridin) (3) zur Prüfung der Frage hergestellt, ob dieses Nucleosid ebenfalls durch Einbau in die Nucleinsäuren und durch Hemmung der Pyrimidin-Biosynthese biochemisch wirksam ist.

3'-Desoxy-uridin (3) wurde erstmals von Todd et al.⁸⁾ in geringer Ausbeute erhalten. Sie konnten zeigen, daß bei der Umsetzung von 2,2'-Anhydro-1-[[β -D-arabinofuranosyl]-uracil mit Natriumäthylmercaptid überwiegend 1-[3-Äthylmercapto-3-desoxy- β -D-xylofuranosyl]-uracil (2) entsteht, da bei Raney-Nickel-Behandlung des acetylierten Reaktionsproduktes neben 3 nur wenig 2'-Desoxy-uridin erhalten wird. Kürzlich konnte 3 und dessen α -Anomeres nach der Methode von Hilbert und Johnson aus 2,4-Dimethoxy-pyrimidin und 2,5-geschützten 3-Desoxy- β -D-ribofuranosylbromiden gewonnen werden⁹⁾.

Wir haben zur Darstellung von 3 den in der Übersicht skizzierten Weg eingeschlagen, der bei erträglichem präparativem Aufwand die Entstehung von 2'-Desoxy-uridin sowie von Anomeren sicher ausschließen sollte. Als Ausgangsprodukt diente Uridin, das nach Fox¹⁰⁾ in 3'-O-Mesyl-2',5'-di-O-trityl-uridin (1) umgewandelt wurde. 1 wurde mit 15 Moläquiv. Natriumäthylmercaptid in Dimethylformamid (DMF) bei 140° umgesetzt und das Reaktionsgemisch anschließend zur Abspaltung der

1) J. G. Lory, R. J. Suhadolnik, B. Resnick und M. A. Rich, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 103, 646 (1965).

2) H. T. Shigeura und G. E. Boxer, Biochem. biophysic. Res. Commun. 17, 758 (1964).

3) H. T. Shigeura und G. E. Boxer, Biochemistry 5, 994 (1966).

4) H. Klenow, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 156 (1961).

5) H. Klenow, Acta chem. scand 17, 983 (1963).

6) H. Klenow und K. Overgaard-Hansen, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 80, 500 (1964).

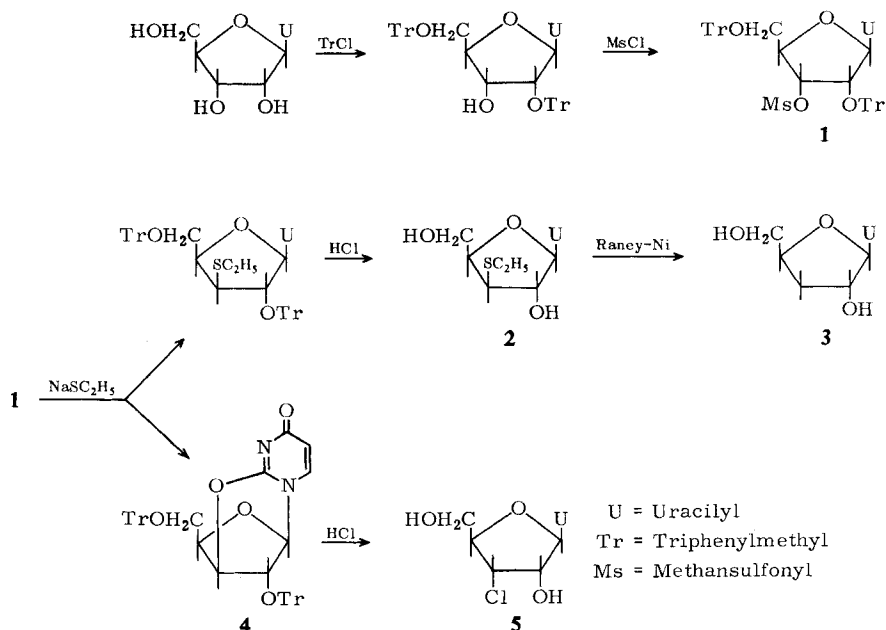
7) K. Overgaard-Hansen, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 80, 504 (1964).

8) D. M. Brown, D. B. Parihar, A. Todd und S. Varadarajan, J. chem. Soc. [London] 1958, 3028.

9) E. Walton, F. W. Holly, G. E. Boxer und R. F. Nutt, J. org. Chemistry 31, 1163 (1966).

10) N. C. Yung und J. J. Fox, J. Amer. chem. Soc. 83, 3060 (1961).

Tritylschutzgruppen mit alkohol. Chlorwasserstoff behandelt. Man erhält einen dunkel gefärbten Sirup, aus dem mittels Verteilungschromatographie an einer Celite-Säule **2** im Gemisch mit zwei Nebenprodukten von ähnlichem chromatographischem Verhalten (Mengenverhältnis 3:1:1) isoliert wird. Letztere werden durch erneute Fraktionierung an einer Kieselgelsäule abgetrennt, wobei chromatographisch einheitliches und analysenreines **2** erhalten wird. **2** erweist sich papier- und dünnschichtchromatographisch in allen geprüften Fließmitteln mit einem nach l.c.⁸⁾ hergestellten Vergleichspräparat als identisch.



Der Hauptteil von **1** geht bei der Umsetzung mit Natriumäthylmercaptid jedoch in 2,3'-Anhydro-1-[2',5'-di-O-trityl- β -D-xylofuranosyl]-uracil (**4**) über. Versuche mit authentischem **4**¹⁰⁾ ergeben, daß dieses weder unter den für die Umsetzung von **1** gewählten Bedingungen noch unter saurer Katalyse¹¹⁾ mit Natriumäthylmercaptid reagiert. Wir nehmen daher an, daß **2** über einen direkten $\text{S}_{\text{N}}2$ -Ersatz der Mesyloxygruppe in **1** durch die Äthylmercaptogruppe gebildet wird. Dagegen entsteht aus **4** beim Behandeln mit alkohol. Chlorwasserstoff (nach l.c.¹⁰⁾) in geringer Menge 3'-Chlor-3'-desoxy-uridin (**5**). Dementsprechend ist eines der beiden Nebenprodukte **5**. Die optimalen Bedingungen für diese Reaktion haben wir jedoch nicht untersucht. Die Struktur des anderen Nebenproduktes bleibt noch zu klären.

Zur Überführung in **3** wird **2** in Methylglykol/Äthanol bei 95° mit einem ca. 25fachen Gewichtsüberschuß an Raney-Nickel behandelt. Überleiten von Wasserstoff unter Verwendung eines Vibrators ist hierbei zweckmäßig.

¹¹⁾ Über säurekatalysierte Reaktionen mit 2,3'- und 2,2'-Anhydro-nucleosiden: J. J. Fox und N. C. Miller, J. org. Chemistry **28**, 936 (1963); J. F. Codington, I. L. Doerr und J. J. Fox, J. org. Chemistry **29**, 558 (1964).

Die Untersuchung der Reaktionslösung ergibt, daß sich darin nur wenig Substanz befindet. Der größte Teil wird von dem oberflächenaktiven Nickel festgehalten und kann davon durch Waschen mit größeren Mengen heißem Äthanol nicht abgelöst werden. Das Nickel muß bei 0° mit verd. Schwefelsäure aufgelöst werden, um das Reaktionsprodukt in Freiheit zu setzen. Nach Neutralisation und vollkommener Trocknung kann es aus dem anorganischen Material mit Äthanol extrahiert werden.

Das Reaktionsgemisch enthält außer **3** nicht umgesetztes **2** sowie geringe Mengen Uracil und Spuren Uridin, die auf einer Kieselgelsäule aufgetrennt werden. Man erhält chromatographisch einheitliches **3**, dessen physikalische Eigenschaften mit den in der Literatur^{8,9)} angegebenen übereinstimmen. Die Gesamtausbeute an **3**, bezogen auf Uridin, beträgt 0,4%.

3 ist gegenüber saurer Hydrolyse recht stabil. Unter den von *Garrett et al.*¹²⁾ angegebenen Bedingungen (*n* HCl bei 80°) zerfällt es mit einer Halbwertszeit von 215 Stdn. und steht damit in seinem hydrolytischen Verhalten den Ribosiden wesentlich näher als den 2'-Desoxy-ribosiden¹³⁾. Diese Tatsache stützt die von *Garrett* vertretene Hypothese über die Schutzfunktion der 2'-Hydroxylgruppe in Ribosiden gegenüber saurer Hydrolyse.

Biochemische Untersuchungen

3 hemmt *in vitro* weder die DNS- noch die RNS-Synthese von *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen (gemessen am Einbau von [³²P]Phosphat und [³H]Thymidin). Die Verbindung hemmt die Thymidin-Phosphorylase (EC. 2.4.2.4) und Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase (EC. 2.4.2.3) nicht und wird durch diese Enzyme nicht gespalten. Auch die Phosphorylierung von Thymidin und Uridin mit Extrakten aus Ascites-Tumorzellen wird durch **3** nicht beeinflusst.

Es kann angenommen werden, daß die mangelnde Wirkung von **3** auf die DNS- und RNS-Synthese darauf beruht, daß die Zelle **3** nicht in das Nucleotid zu überführen vermag, d.h. die letale Biosynthese ausbleibt. Untersuchungen an zellfreien Systemen mit synthetisch hergestellten Nucleotiden von **3** sind in Vorbereitung.

Herrn Prof. Dr. K. *Repke* danken wir für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit. Für große Einsatzbereitschaft bei der experimentellen Arbeit möchten wir Herrn K. *Gaertner* unseren Dank aussprechen.

Beschreibung der Versuche

Dünnschichtchromatographie: Mit Kieselgel HF₂₅₄ (Merck, Darmstadt), Schichtdicke 0,20 mm, Steighöhe 12–15 cm. Die Substanzen wurden im UV-Licht durch Fluoreszenzlösung lokalisiert.

Papierchromatographie: Absteigend auf Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043b. Die Substanzen wurden durch ihre UV-Absorption lokalisiert.

Fließ- bzw. Elutionsmittel: A = Essigester/Isopropylalkohol/Wasser (12:1:6); B = Chloroform/Methanol (9:1); C = wie B (92:8); D = Chloroform/96proz. Äthanol (8:2); E = Benzol/96proz. Äthanol (8:2); F = n-Butanol/Eisessig/Wasser (5:2:3); G = n-Butanol/Wasser (86:14).

¹²⁾ E. R. *Garrett*, J. K. *Seydel* und A. J. *Sharpen*, J. org. Chemistry **31**, 2219 (1966).

¹³⁾ K. E. *Pfitzner* und J. G. *Moffatt*, J. org. Chemistry **29**, 1508 (1964).

UV-Spektren wurden mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer Beckman DK-2 aufgenommen *).

 R_F -Werte

Verbindung	Papierchromatographie Fließmittel		Dünnschicht- chromatographie Fließmittel
	F	G	D
1-[3-Äthylmercapto-3-desoxy- β -D-xylofuranosyl]-uracil (2)	0.73	0.52	0.41
Nebenprodukt			
Fraktion I	0.73	0.51	0.46
3'-Chlor-3'-desoxy-uridin (5)	0.73	0.52	0.32
3'-Desoxy-uridin (3)	0.60	0.30	0.17
2'-Desoxy-uridin	0.58	0.28	0.13
Uracil	0.55	0.34	0.28
Uridin	0.47	0.19	0.09

1-[3-Äthylmercapto-3-desoxy- β -D-xylofuranosyl]-uracil (2): 8.30 g $\mathbf{1}^{10)}$ werden in 125 ccm trockenem DMF gelöst und unter Rühren mit 8.30 g NaSC_2H_5 versetzt. Das Gemisch wird insgesamt 20 Stdn. unter N_2 auf 140° erhitzt, wobei nach 8 Stdn. weitere 4.00 g NaSC_2H_5 zugesetzt werden. Anschließend destilliert man das DMF i. Ölpumpenvak. weitgehend ab und nimmt den verbleibenden dunkelbraunen Sirup in 600 ccm absol. Äthanol auf. Die alkohol. Lösung wird bei 0° mit *Chlorwasserstoff* gesättigt und danach 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Das Äthanol wird i. Vak. abdestilliert. Der sirupöse Rückstand (18 g) wird in ca. 7 ccm der unteren (wäßr.) Phase von Fließmittel A gelöst, an 25 g Celite¹⁴⁾ adsorbiert und an einer Celite-Säule (Durchmesser 30 mm, Füllung mit 350 g Celite) chromatographiert. Elutionsmittel: obere Phase von A, 4.5 ccm/Fraktion. Der Verlauf der Trennung wird dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Die Fraktionen 17–123 werden vereinigt und i. Vak. zur Trockene eingeengt. Man erhält 0.95 g braunen, glasigen Schaum, der in Methanol/Wasser (4:1) gelöst und mit ca. 100 mg Aktivkohle entfärbt wird. Nach Einengen der Lösung i. Vak. werden 0.72 g Rohprodukt erhalten. Die Rohprodukte von vier derartigen Ansätzen (2.8 g) werden zusammen in Chloroform gelöst, die Lösung mit ca. 20 g Kieselgel (0.2–0.5 mm, Merck, Darmstadt) versetzt und das Chloroform i. Vak. abdestilliert. Das so am Kieselgel adsorbierte Produkt wird auf eine Dreistufensäule (Durchmesser 18, 27 und 35 mm, Stufenhöhe je 350 mm) gebracht, in die zuvor 250 g Kieselgel mit Fließmittel B eingeschlämmt wurden. Elutionsmittel C, 3.5 ccm/Fraktion. Der Verlauf der Trennung wird dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Die Fraktionen 296–359 (I), 370–464 (II) und 500–630 (III) enthalten drei verschiedene, chromatographisch einheitliche Substanzen. Nach Einengen i. Vak. werden erhalten:

Aus I: 0.45 g einer nicht näher untersuchten Substanz vom Schmp. $193-194^\circ$ (aus Äthanol). $[\alpha]_D^{25}$: -13.9° (c 1.22, H_2O). UV (H_2O): λ_{max} 260 nm, λ_{min} 229.5 nm.

Gef. C 49.85 H 4.71 N 11.31

Aus III: 0.38 g 3'-Chlor-3'-desoxy-uridin (5) als glasiger Schaum. $[\alpha]_D^{25}$: $+25.7^\circ$ (c 1.52, H_2O). UV (H_2O): λ_{max} 262 nm (ϵ_{max} 11 150), λ_{min} 231 nm (ϵ_{min} 3 300).

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5$ (262.7) Ber. C 41.15 H 4.22 Cl 13.50 N 10.67

Gef. C 40.92 H 5.18 Cl 13.74 N 10.68

*) Wir danken Herrn Dr. J. Malur, physikalisch-chemisches Laboratorium unseres Instituts, für die Aufnahmen der Spektren.

¹⁴⁾ Produkt der Firma Johns-Manville Corporation.

Aus II: 1.24 g **2** als glasiger Schaum. UV (H₂O): $\lambda_{\max}$ 262 nm ($\epsilon_{\max}$ 12 300), $\lambda_{\min}$ 231 nm ($\epsilon_{\min}$ 3 300).

C₁₁H₁₆N₂O₅S (288.3) Ber. C 45.82 H 5.59 N 9.72 Gef. C 45.43 H 6.01 N 9.79

Durch Aufarbeiten aller Zwischenfraktionen werden noch 0.10 g **2** erhalten. Gesamtausbeute 1.34 g (11 %).

3'-Desoxy-uridin (**3**): 1.20 g **2** werden in 75 ccm Methylglykol/Äthanol (75 : 30) gelöst und ca. 20 g frisch vorbereitetes Raney-Nickel¹⁵⁾ zugegeben. Die Suspension wird unter Verwendung eines Vibrators in einer H₂-Atmosphäre 3 Std. auf 95° (Innentemperatur) erhitzt. Danach werden weitere 10 g Raney-Nickel zugefügt und das Erhitzen noch 2 Std. fortgesetzt. Nach dem Abkühlen wird das Nickel abgesaugt und bei 0° 1 Stde. mit ca. 2n H₂SO₄ gerührt. Das ungelöste Nickel wird abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen und nochmals 2 Std. mit ca. 3n H₂SO₄ behandelt. Die vereinigten Filtrate werden mit NaHCO₃ neutralisiert, i. Vak. zur Trockene eingengt und mehrfach mit absol. Äthanol nachdestilliert. Der getrocknete und pulverisierte Rückstand wird so lange mit 96proz. Äthanol extrahiert, bis im Filtrat keine UV-Absorption mehr vorhanden ist. Die Alkoholextrakte werden i. Vak. zur Trockene eingengt. Der Rückstand (0.73 g) wird in wenig Chloroform gelöst, an 7 g Kieselgel (0.05 bis 0.2 mm) adsorbiert und in einer Kieselgelsäule (Durchmesser 23 mm, 120 g Kieselgel) mit Elutionsmittel E aufgetrennt, 1.6 ccm/Fraktion. Die Fraktionen 510–714 werden vereinigt und i. Vak. zur Trockene eingengt. Rohausb. 0.21 g (22 %). Nach Umkristallisieren aus 3 ccm Methanol werden 0.14 g (15 %) **3** vom Schmp. 178–179° (Lit.: 178°⁸⁾, 178–179°⁹⁾) erhalten. $[\alpha]_D^{25}$: +25.4° (c 1.38, H₂O), (Lit.⁹⁾: +25° [c 1.02, H₂O]). UV (H₂O): $\lambda_{\max}$ 263 nm ($\epsilon_{\max}$ 10 300), $\lambda_{\min}$ 231 nm ($\epsilon_{\min}$ 2100).

C₉H₁₂N₂O₅ (228.2) Ber. C 47.37 H 5.30 N 12.28 Gef. C 47.07 H 5.45 N 12.05

Biochemische Untersuchungen: Die DNS- und RNS-Synthese der Ascites-Tumorzellen in vitro wurde im wesentlichen nach früher beschriebenen Methoden^{16,17)} untersucht mit der Abänderung, daß die Größe der Versuchsansätze nur 0.3 ccm, entsprechend 10 mg Zellen, betrug und bei ³²P-Phosphat-Versuchen die DNS mit 10proz. NaCl-Lösung (1 Stde. bei 100°) extrahiert wurde. Die Zusammensetzung der Enzymsätze zur Untersuchung der Phosphorylierung von Thymidin und Uridin entsprach im wesentlichen den Angaben von Behki und Schneider¹⁸⁾. Die phosphorylierten Produkte wurden papierchromatographisch nachgewiesen (für Thymidin-Phosphate im Fließmittel Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 12:1:7 und für Uridin-Phosphate im Fließmittel Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser = 7:1:2 v/v).

¹⁵⁾ X. A. Dominguez, I. C. Lopez und R. Franco, J. org. Chemistry **26**, 1625 (1961).

¹⁶⁾ P. Langen und E. Liß, Biochem. Z. **335**, 187 (1961).

¹⁷⁾ P. Langen und K. Repke, Acta biol. med. german. **17**, K15 (1966).

¹⁸⁾ R. M. Behki und W. C. Schneider, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **68**, 34 (1963).