

FRIEDRICH CRAMER und HANS NEUNHOEFFER

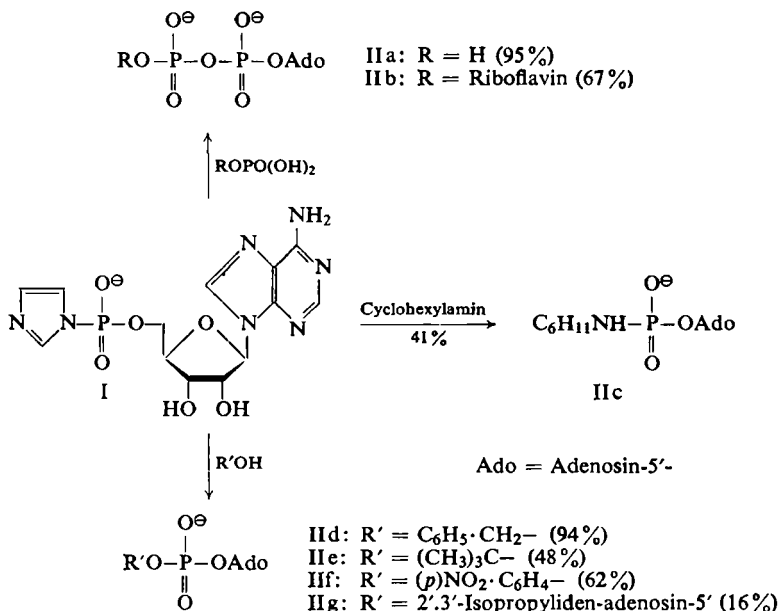
Zur Chemie der „energiereichen Phosphate“, XV¹⁾**Reaktionen von Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid — eine neue Synthese von Adenosindiphosphat und Flavin-adenin-dinucleotid**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 16. September 1961)

Adenosyl-(5')-imidazolylphosphonat (I) reagiert mit primären und tertiären Alkoholen sowie mit Phenolen zu Estern der Adenosinphosphorsäure, mit Orthophosphat zu Adenosindiphosphat, mit Riboflavinphosphat zu Flavin-adenin-dinucleotid.

In der XI. Mitteilung²⁾ haben wir eine einfache und ergiebige Synthese des Imidazolid der Adenosin-5'-phosphorsäure (I) aus *N,N'*-Carbonyl-diimidazol und Adenosin-5'-phosphat beschrieben. Einen zweiten Weg zur Darstellung von I fanden wir in der Umsetzung von AMP mit Imidazol in Gegenwart von Trichloracetonitril als wasserabspaltendem Reagens³⁾. Wir teilen heute Reaktionen von I mit, die zur Darstellung zahlreicher Nucleotid-Derivate geeignet sind.



¹⁾ XIV. Mitteil.: F. CRAMER, K.-H. SCHEIT und H.-J. BALDAUF, Chem. Ber. **95**, 1657 [1962], vorstehend.

²⁾ F. CRAMER, H. SCHALLER und H. A. STAAB, Chem. Ber. **94**, 1612 [1961].

³⁾ F. CRAMER und G. WEIMANN, Chem. Ber. **94**, 996 [1961].

I kann als kristallisiertes Natriumsalz erhalten werden²⁾. Eine Isolierung von I ist nicht notwendig; wir verwenden meistens die Lösung des Imidazoliumsalzes von I in Dimethylformamid⁴⁾ direkt zu weiteren Umsetzungen.

Zur Darstellung von Nucleotidestern wird I mit einem ca. 10fach molaren Überschuß an Alkohol längere Zeit bei 50° gehalten. Mit einer äquimolaren Menge Orthophosphorsäure liefert I in nahezu quantitativer Ausbeute Adenosindiphosphat (IIa). Das Produkt ist meist direkt so rein, daß sich die bei anderen Synthesen^{4,5)} notwendige Trennung durch Ionenaustauscher-Chromatographie erübrigt. Mit Riboflavinphosphat (Flavin-mononucleotid) entsteht fast ohne Nebenprodukte Flavin-adenindinucleotid⁶⁾ (IIb), welches sich als Natriumsalz in 67-proz. Ausbeute isolieren läßt.

Mit Aminen bildet I leicht Adenosin-5'-phosphorsäure-amide, z. B. ergab die Reaktion mit Cyclohexylamin IIc in 41-proz. Ausbeute. Sehr leicht verläuft die Umsetzung mit primären Alkoholen, wobei sich die entsprechenden [Adenosyl-(5')]-alkyl-phosphate bilden (Benzylalkohol lieferte mit I in 94-proz. Ausbeute II d). Auch tertiäre Alkohole, die sonst schwer umzusetzen sind, reagieren mit I; so liefert die Umsetzung mit tert.-Butanol IIe in 48-proz. Ausbeute. Besonders rasch verläuft auch die Umsetzung mit *p*-Nitro-phenol (62% Ausb. an II f). In den drei dargestellten Estern stehen Derivate des AMP mit spezifisch geschützten Gruppen zur Verfügung: Im Benzyl-[adenosyl-(5')]-phosphat (II d) läßt sich die Benzylgruppe durch Hydrogenolyse entfernen⁷⁾, im entsprechenden *p*-Nitro-phenylester (II f) wird die schützende Gruppe durch alkalische Hydrolyse abgespalten⁸⁾, und die tert.-Butylgruppe in II e läßt sich leicht sauer abspalten⁹⁾.

Die Möglichkeit zur Darstellung dieser Verbindungen (II) ist für die schrittweise Synthese von Oligonucleotiden wichtig. Einerseits kann I mit an der 2'- und 3'-Stelle blockierten Nucleosiden umgesetzt werden: Ein Modellversuch mit 2'.3'-Isopropylidenadenosin ergab in 16-proz. Ausbeute [2'.3'-Isopropylidenadenosyl-(5')]-[adenosyl-(5')]-phosphat (II g); andererseits können an Nucleosid-alkyl-phosphaten wie II d und II e direkt Phosphorylierungen an der freien 2'- bzw. 3'-Stellung des Nucleotids vorgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid (I)*¹⁰⁾: 365.3 mg käufliche *Adenosin-5'-phosphorsäure* (1 Mol. Wasser) und 353.7 mg *Tri-n-octylamin* wurden solange mit 50 ccm absol. Methanol und 50 ccm absol. Äthanol unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß gekocht, bis sich alles gelöst hatte. Nun wurde i. Vak. bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit 50 ccm absol. Dioxan versetzt und dieses jeweils i. Vak. abgezogen. Der Rückstand wurde i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Die Ausbeute an *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* ist quantitativ.

⁴⁾ Vgl. auch die Ergebnisse von L. GOLDMAN, J. W. MARSICO und G. W. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **82**, 2969 [1961].

⁵⁾ R. W. CHAMBERS und H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3749 [1958]; J. G. MOFFATT und H. G. KHORANA, ebenda **83**, 649 [1961].

⁶⁾ Frühere Synthesen: a) S. M. H. CHRISTIE, G. W. KENNER und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1954**, 46; b) F. M. HUENNEKENS und G. L. KILGOUR, J. Amer. chem. Soc. **77**, 6716 [1955]; c) J. G. MOFFATT und H. G. KHORANA, ebenda **80**, 3756 [1958].

⁷⁾ Vgl. z. B. A. M. MICHELSON und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2476.

⁸⁾ R. W. CHAMBERS, J. G. MOFFATT und H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3747 [1957].

⁹⁾ F. CRAMER, Angew. Chem. **73**, 344 [1961].

¹⁰⁾ Die l. c. 2) angegebene Darstellungsweise wurde bevorzugt benutzt.

Die Lösung von 70 mg (0.1 mMol) dieses Salzes in 20 ccm Dimethylformamid ließ man einer Lösung von 136 mg (2 mMol) *Imidazol* und 72 mg (0.5 mMol) Trichloracetnitril in 25 ccm Dimethylformamid im Verlaufe von 2 Stdn. zutropfen. 4 Tage später wurde bei 0.5 Torr eingedampft, der Rückstand zweimal mit 10 ccm Äther und zweimal mit 10 ccm Benzol digeriert, dann in etwa 10 ccm Methanol gelöst und chromatographisch getrennt (Flächenchromatographie, Lösungsmittel A). Das Imidazolid wurde 5 mal mit Methanol/Triäthylamin (10:1) eluiert, die Lösung i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 2–3 ccm Methanol aufgenommen, 18.3 mg (0.15 mMol) NaClO_4 in 5 ccm Aceton zugegeben und mit 5 ccm Aceton und 10 ccm Äther versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und zweimal mit Aceton und Äther gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über P_2O_5 erhielt man 18.5 mg *I* (43% d. Th.). Bei diesem und den anderen Nucleotiden wurde die Reinheit kolorimetrisch im UV bei 259 μ bestimmt (ϵ von Adenin = $15 \cdot 10^3$). Absorption einer $0.934 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 1.401, gef. 1.414.

$\text{NaC}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}$ (419.3) Ber. P 7.39 Gef. P 7.31

Verhältnis P : Adenin = 1 : 1.02

2. *Adenosin-5'-phosphorsäure-benzylester (IID)*: Die mit 108.1 mg (1 mMol) *Benzylalkohol* versetzte Lösung von 41.9 mg (0.1 mMol) *I* (Na-Salz) in 20 ccm Dimethylformamid blieb 14 Tage unter Feuchtigkeitsausschluß bei 50° stehen. Danach war alles Imidazolid verschwunden, während neben dem Benzylester nur ganz geringe Spuren Adenosin-5'-phosphorsäure auftraten. Die Lösung wurde bei 0.3 Torr zur Trockne eingedampft und zweimal mit Aceton gewaschen. Nun wurde in 1–2 ccm Methanol aufgenommen, 6.1 mg (0.05 mMol) NaClO_4 in 2 ccm Aceton sowie 4 ccm Aceton und 8 ccm Äther zugegeben, der Niederschlag abzentrifugiert, mit Aceton und Äther gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Ausb. 43 mg (94% d. Th.) *Na-Salz von II d.* Absorption einer $1.45 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 2.175, gef. 2.200.

$\text{NaC}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$ (459.4) Ber. P 6.74 Gef. P 6.75

Verhältnis P : Adenin = 1 : 1.01

3. *Adenosin-5'-phosphorsäure-tert.-butylester (IIE)*: Zu einer 4 Tage alten Lösung, bestehend aus 35.5 mg (0.05 mMol) *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* und 32.4 mg (0.2 mMol) *N,N'-Carbonyl-diimidazol* in 20 ccm Dimethylformamid, wurden 74.1 mg (1 mMol) absol. *tert.-Butylalkohol* gegeben. Diese Lösung blieb 14 Tage bei 50° unter Feuchtigkeitsausschluß stehen. Auf dem Chromatogramm waren 3–4 Flecke zu sehen, obwohl die Lösung des Imidazolids praktisch reines Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid zeigte. Die Lösung wurde nun i. Vak. bis zur Trockne eingedampft, zweimal mit Äther und Benzol digeriert und chromatographisch aufgearbeitet (Flächenchromatographie, Lösungsmittelgemisch A). Es wurde 5 mal mit Methanol eluiert, die Lösungen i. Vak. bis zur Trockne eingedampft, in 2 ccm Methanol aufgenommen, 10 mg NaClO_4 (0.08 mMol) in 3 ccm Aceton sowie 3 ccm Aceton und 6 ccm Äther wurden zugegeben. Der Niederschlag wurde wie oben aufgearbeitet. Ausb. 10 mg *Na-Salz von IIE* (48% d. Th.). Absorption einer $1.175 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 1.762, gef. 1.782.

$\text{NaC}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$ (425.3) Ber. P 7.27 Gef. P 7.07

Verhältnis P : Adenin = 1 : 1.04

4. *Adenosin-5'-phosphorsäure-p-nitrophenylester (IIF)*: Entsprechend der Vorschrift für IIE wurden aus 35.5 mg (0.05 mMol) *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* und 139.1 mg (1.0 mMol) frisch umkrist. *p-Nitro-phenol* 15.3 mg *Na-Salz von IIE* erhalten (62% d. Th.). Absorption einer $1.052 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 1.578, gef. 1.575.

$\text{NaC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ (490.3) Ber. P 6.32 Gef. P 6.31

Verhältnis P : Adenin = 1.0 : 1.0

5. *Adenosin-5'-phosphorsäure-cyclohexylamid (IIc)* wurde analog IIe aus 35.5 mg (0.05 mMol) *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* und 99.2 mg (1 mMol) *Cyclohexylamin* dargestellt. Ausb. 9.6 mg *Na-Satz IIc* (41% d. Th.). Absorption einer $0.809 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 1.214, gef. 1.195.

$\text{NaC}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ (450.4) Ber. P 6.64 Gef. P 6.73

Verhältnis P : Adenin = 1.03:1.00

6. *Adenosin-5'-diphosphat (IIa)*: Zu einer Lösung von 700 mg (1 mMol) *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* und 650 mg (4 mMol) *N.N'-Carbonyl-diimidazol* in 15 ccm absol. Dimethylformamid (8 Tage bei Raumtemperatur) wurde eine Lösung von 98 mg (1 mMol) *Orthophosphorsäure*¹¹⁾ in 5 ccm absol. Dimethylformamid und 1 ccm absol. Pyridin gegeben. Nach 24stdg. Verwahren bei Raumtemperatur (nachträgliches Erwärmen der Reaktionslösung erwies sich als nachteilig, da ADP, in Dimethylformamid gelöst, bereits bei 50° langsam in AMP und Phosphorsäure zerfiel) zeigte das Chromatogramm fast ausschließlich *IIa* neben geringen Verunreinigungen durch AMP. Die Reaktionslösung wurde unter 0.5–2 Torr eingedampft, der Rückstand in möglichst wenig Methanol aufgenommen, mit 183.8 mg (1.5 mMol) NaClO_4 in 5 ccm Aceton versetzt und die Fällung durch Zugabe von Aceton und wenig Äther vervollständigt. Auf eine chromatographische Reinigung wurde wegen der nur geringen Verunreinigungen verzichtet¹²⁾. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über P_2O_5 und NaOH getrocknet. Ausb. 447.6 mg *Dinatriumsalz von IIa* (95% d. Th.). Absorption einer $0.983 \cdot 10^{-4}$ mol. Lösung: Ber. 1.475, gef. 1.503.

$\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$ (471.2) Ber. P 13.15 Gef. P 13.02

Verhältnis P : Adenin = 2.00 : 1.03

7. *Flavin-adenin-dinucleotid (IIb)*: Eine Lösung, die aus 405 mg (0.5 mMol) des *Mono-tri-n-octylammoniumsalzes der Riboflavin-5'-phosphorsäure*¹³⁾ in 10 ccm absol. *Dimethylformamid* und 2.5 ccm absol. Pyridin bestand, wurde zu einer Lösung von 420.5 mg (0.6 mMol) *Mono-tri-n-octylammoniumsalz der Adenosin-5'-phosphorsäure* und 389.2 mg (2.4 mMol) *N.N'-Carbonyl-diimidazol* in 25 ccm absol. Dimethylformamid gegeben. Die Imidazolidlösung war etwa 2–3 Wochen alt. Nach etwa 24 Stdn. war das Riboflavinphosphat auf Grund des Papierchromatogramms verschwunden. Als Hauptprodukte traten IIb und unumgesetztes Adenosin-(5')-phosphorsäure-imidazolid auf. Die Lösung wurde unter 1–3 Torr eingedampft, der Rückstand in etwa 8 ccm Methanol aufgenommen, mit 122.5 mg (1 mMol) Natriumperchlorat in 5 ccm Aceton versetzt und durch Zugabe von Aceton und etwas Äther ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über P_2O_5 und NaOH getrocknet. Ausb. 380.0 mg *Dinatriumsalz von IIb* (91.6% d. Th.).

Reinigung des Rohproduktes: 80.0 mg des erhaltenen Rohproduktes wurden an einer Säule chromatographisch gereinigt. Die Säule hatte einen inneren Durchmesser von 25 mm, die Füllhöhe betrug 450 mm. Als feste Phase wurde Solka-Flok-Cellulose (SW-40-B) verwendet, als Lösungsmittel diente Propanol-(1)/Ammoniak/Wasser (6:3:1). Es traten 6 verschiedene Zonen auf, wobei die 3. Zone aus unumgesetztem I bestand und die 4. Zone, die Hauptmenge, das

¹¹⁾ Bei Einsatz des Bis-triäthylammoniumsalzes der Orthophosphorsäure tritt auch im Verlaufe mehrerer Tage praktisch keine Reaktion ein.

¹²⁾ Bei anderen Versuchen, die z. T. unter etwas veränderten Bedingungen durchgeführt wurden, traten größere Verunreinigungen auf, auch wurde bei einigen Versuchen die Bildung von ATP beobachtet.

¹³⁾ Das Riboflavin-5'-phosphat wurde uns in Form des Natriumsalzes von der Firma SIGMA CHEMICAL COMPANY, St. Louis 18, Mo. USA, kostenlos zur Verfügung gestellt. Zur Reaktion wurde es durch Ionenaustausch in das Mono-tri-n-octylammoniumsalz übergeführt.

gesuchte Produkt darstellte. Die ersten beiden Zonen waren gelb-braun gefärbt, machten jedoch nicht mehr als 1% der gesamten Menge aus und konnten daher nicht identifiziert werden. Die 5. und 6. Zone stellten Verunreinigungen dar, die durch Riboflavinphosphat in die Reaktion eingebracht worden waren. Es dürfte sich um dessen Zersetzungsprodukte gehandelt haben, da sie beim Aufarbeiten einer chromatographisch gereinigten Lösung von Riboflavin-5'-phosphat wieder auftraten. Die 4. Fraktion wurde unter 0.5–2 Torr eingedampft, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen, mit 35.4 mg Natriumperchlorat in 3 cm Aceton versetzt und durch Zugabe von Aceton und Äther ausgefällt. Nach dem Absaugen wurde der Niederschlag mit Aceton und Äther gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ und NaOH getrocknet. Ausb. 53.7 mg (67.1% d. Th.). Die Substanz war chromatographisch einheitlich.

Na₂C₂₇H₃₁O₁₅N₉P₂·H₂O (847.6) Ber. C 38.26 H 3.92 N 14.87 P 7.31
Gef. C 38.57 H 3.93 N 14.75 P 7.23

R_F-Werte ¹⁴⁾ (auf Whatman 1)

	5-proz. wäbr. Lösung von Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	Propanol-(1)/ NH ₃ /H ₂ O (6:3:1)
Riboflavin-5'-phosphat	0.39	0.14
Flavin-adenin-dinucleotid	0.48	0.14

Das Absorptionsverhältnis in Puffer pH 7 war:

260 mμ : 450 mμ	3.27 (Lit. ^{6a}) : 3.28)
375 mμ : 450 mμ	0.82 (Lit. ^{6c}) : 0.82)

8. [Adenosyl-(5')]-[2'.3'-isopropyliden-adenosyl-(5')]-phosphat (II g): Analog II e aus 307.3 mg Isopropyliden-adenosin. Ausb. 5.5 mg Na-Salz von II g (16.3% d. Th.). Absorption einer 0.852·10⁻⁴ mol. Lösung: Ber. 1.278, gef. 1.334.

NaC₂₃H₂₈N₂₀O₂₀P (658.5) Ber. P 4.59 Gef. P 4.63
Verhältnis P : Adenin = 1.0 : 2.07

Tabelle der R_F-Werte

	Lösungsmittel				
	A	B	C	D	E
Adenosin-5'-monophosphat	0.21	0.11	0.00	0.35	0.34
Adenosin-5'-diphosphat	0.14	0.07	0.00	0.18	0.23
Adenosin-5'-triphosphat	0.09	0.03	0.00	0.13	0.21
Isopropyliden-adenosin	0.80	0.76	0.72	0.77	0.78
Adenosin-5'-phosphorsäure-methylester	0.50	0.37	0.23	0.56	
Adenosin-5'-phosphorsäure-äthylester	0.53	0.49		0.52	0.55
Adenosin-5'-phosphorsäure-tert.-butylester	0.64	0.54	0.26	0.63	
Adenosin-5'-phosphorsäure-hexylester	0.58	0.54		0.56	0.47
Adenosin-5'-phosphorsäure-benzylester	0.64	0.34		0.65	0.37
Adenosin-5'-phosphorsäure-p-nitrophenylester	0.69	0.59	0.31	0.64	0.56
[Isopropyliden-adenosyl-(5')]-adenosin-(5')-phosphorsäure	0.54	0.42	0.15	0.59	0.47
Adenosin-5'-phosphorsäure-amid	0.34		0.12		
Adenosin-5'-phosphorsäure-cyclohexylamid	0.69	0.42	0.35	0.72	
Adenosin-5'-phosphorsäure-anilid	0.60	0.43			
Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid	0.57	0.38	0.27	0.58	

¹⁴⁾ Die gefundenen R_F-Werte entsprechen denjenigen von G. L. KILGOUR, S. P. FELTON und F. M. HUENNEKENS, J. Amer. chem. Soc. 79, 2254 [1956].

9. Einige weitere analoge Umsetzungen wurden in kleinen Mengen ausgeführt, die Ansätze wurden jedoch nicht aufgearbeitet. Die R_F -Werte der entstandenen Verbindungen sind in der vorstehenden Tabelle mit aufgeführt.

10. *Papierchromatographie*

Lösungsmittel A: Propanol-(1)/NH₃/H₂O 6 : 3 : 1

Lösungsmittel B: Propanol-(2)/NH₃/H₂O 7 : 1 : 2

Lösungsmittel C: Propanol-(2)/NH₃/H₂O 8 : 1 : 1

Lösungsmittel D: Propanol-(2)/1-proz. Ammoniumsulfatlösung 2 : 1

Lösungsmittel E: Ameisensäure/tert.-Amylalkohol/H₂O 2 : 3 : 1

Die Laufdauer betrug im Durchschnitt 15 Stdn. Die gelaufene Strecke schwankte zwischen 30 und 35 cm, selten zwischen 25 und 30 cm. Papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b gewaschen.