

KARL-HEINZ SCHEIT und WOLFGANG KAMPE

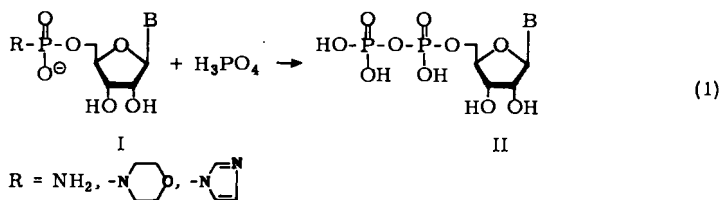
Eine einfache Methode zur Darstellung von Nucleosid-diphosphaten¹⁾

Aus der Chemischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt
der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen

(Eingegangen am 3. Oktober 1964)

[2-Cyan-äthyl]- α -pyridyl-phosphat reagiert mit Nucleosid-5'-phosphaten zu Nucleosid-5'-diphosphorsäure-*P*2-[2-cyan-äthylestern]. Nach Abspaltung der Cyanäthylgruppe durch milde alkalische Hydrolyse erhält man Nucleosid-5'-diphosphate in guten Ausbeuten.

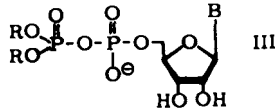
Bisher erfolgte die Synthese von Nucleosid-5'-diphosphaten durch Reaktion aktivierter Nucleotid-Derivate mit Orthophosphorsäure. Solche aktive Verbindungen sind Amide²⁾, Imidazolide³⁾ und Morpholide⁴⁾.



Die Darstellung der aktivierten Verbindungen I aus Nucleotid und Amin in Gegenwart eines Kondensationsmittels (z. B. Dicyclohexylcarbodiimid oder Trichloracetonitril) bereitet jedoch Schwierigkeiten, da die Reaktion nur bei höherer Temperatur und selbst dann nicht immer quantitativ verläuft. Die Nucleosid-5'-phosphorsäureamide müssen daher durch Anionenaustauscher-Säulenchromatographie gereinigt werden. Vorteilhafter lassen sich die Nucleosid-5'-[phosphorsäure-imidazolide] unter Verwendung von *N,N'*-Carbonyldiimidazol⁵⁾ bereiten. Bei Adenylsäure und Cytidylsäure besteht jedoch die Gefahr der Bildung von Harnstoffderivaten.

Auch Diphosphorsäure-triester vom Typ III können mit Orthophosphorsäure zu II reagieren^{6, 7)}.

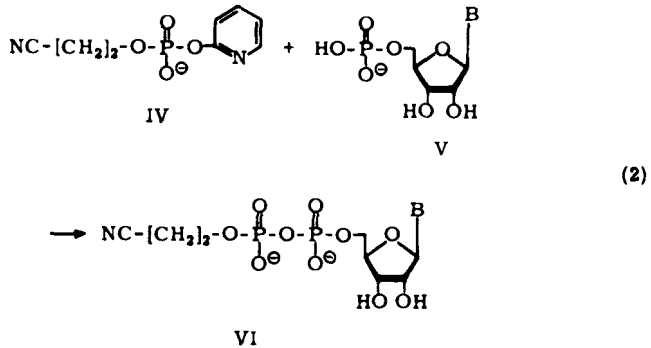
- 1) VI. Mitteil. „Reaktive Ester heterocyclischer Alkohole“; V. Mitteil.: W. KAMPE, Chem. Ber. **98**, 1038 [1965], vorstehend.
- 2) R. V. CHAMBERS, H. G. KHORANA und J. G. MOFFAT, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4240 [1957], und zwar S. 4257.
- 3) F. CRAMER und H. NEUNHOEFFER, Chem. Ber. **95**, 1664 [1962].
- 4) J. G. MOFFAT und H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **83**, 649 [1961].
- 5) H. SCHALLER, H. A. STAAB und F. CRAMER, Chem. Ber. **94**, 1621 [1961].
- 6) R. WITTMANN und F. CRAMER, Chem. Ber. **94**, 322, 329 [1961].
- 7) A. M. MICHELSON, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1958; A. M. MICHELSON, The Chemistry of Nucleotides and Nucleosides, S. 224, Academic Press, New York, London 1963.



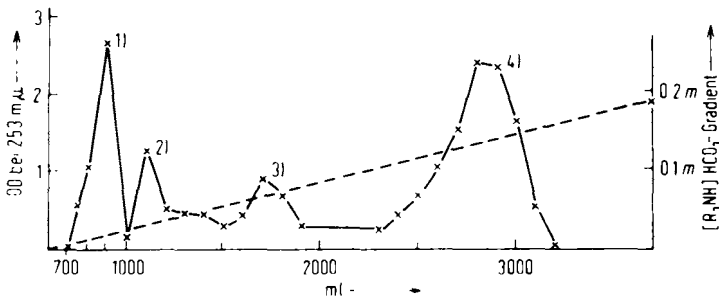
Da die Verbindungen III sehr reaktiv sind, können leicht Nebenreaktionen (mit OH-Gruppen der Ribose oder NH₂-Gruppen der Nucleobasen) eintreten.

Die von uns gefundene Nucleosid-5'-diphosphat-Synthese verläuft nicht über ein zu aktivierendes Nucleotid.

α -Pyridylphosphate reagieren mit Phosphorsäure-monoestern zu unsymmetrischen Diphosphaten (vgl. vorstehende Mitteil.). So entstehen aus [2-Cyan-äthyl]- α -pyridylphosphat (IV) und Nucleosid-5'-phosphaten (V) Nucleosid-5'-diphosphorsäure-P²-[2-cyan-äthylester] (VI). Der Cyanäthylrest in VI und IV läßt sich in 2*n* NaOH bei 0° in 30 Min. entfernen, wobei die Diphosphate (II) und α -Pyridylphosphat erhalten werden.



Nach Neutralisation der alkalischen Lösung durch sauren Ionenaustauscher wird das Reaktionsgemisch an DEAE-Cellulose durch Gradientenelution mit Triäthylammonium-hydrogencarbonatlösung getrennt. Die Abbild. zeigt ein typisches Elutionsdiagramm.



Typisches Elutionsdiagramm (s. Text) bei Umsetzung nach Gl. (2)

- | | |
|---|---------------------------|
| 1) Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester | 3) Adenosin-5'-phosphat |
| 2) α -Pyridylphosphat und Adenosin-5'-phosphat | 4) Adenosin-5'-diphosphat |

Nach 2—4 Tagen betragen die Ausbeuten an II im allgemeinen 60%, bez. auf V.

In einer Nebenreaktion, über deren Mechanismus noch keine völlige Klarheit besteht, werden aus IV und V Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester (I, R = α -Pyridyloxy) sowie 2-Cyan-äthylphosphat gebildet. Dieser Austausch des α -Pyridylrestes wird bei der Darstellung unsymmetrischer *Alkyl*- oder *Aryl*-diphosphate vom Typ VI nicht beobachtet⁸⁾. Die Reaktion (2) verläuft am besten in Pyridin bei Raumtemperatur. Andere Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd oder Mischungen derselben mit Pyridin, erwiesen sich als weniger geeignet.

Das Ausmaß der erwähnten Nebenreaktion hängt entscheidend davon ab, ob die Verbindungen V als Salze schwacher oder starker Basen eingesetzt werden. Mit Pyridin als Base erhält man nahezu 40% (bez. auf V) an nicht erwünschtem Nucleosid-5'-phosphorsäure- α -pyridylester. Mit den Monotriäthylammoniumsalzen von V entstehen dagegen nur 10% dieses Nebenproduktes.

Der Vorteil dieser Methode zur Synthese von Nucleosid-diphosphaten liegt darin, daß die Darstellung und aufwendige Reinigung der Verbindungen I wegfällt. Außerdem gestattet sie, auf einfache Weise die Pyrophosphate komplizierter Phosphorsäure-monoester (Oligonucleotide mit 5'-Phosphatgruppe) herzustellen.

Wir danken Fräulein H. STÖTERS und Fräulein I. GONTER für fleißige Mitarbeit, Herrn Prof. Dr. F. CRAMER für wohlwollende Unterstützung.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Pyridin wurde destilliert und mehrere Tage über Calciumhydrid getrocknet. Die Nucleosid-5'-phosphate stammten von der Firma Zellstoff Waldhof (Mannheim). Das Einengen von Lösungen erfolgte im Rotationsverdampfer; die Vorlage wurde dabei mit Trockeneis/Methanol gekühlt. Alle Chromatogramme (Papier Schleicher & Schüll 2043 b gewaschen) wurden in Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1) absteigend entwickelt.

[2-Cyan-äthyl]- α -pyridyl-phosphat erhielten wir nach l. c.⁹⁾

Adenosin-5'-diphosphat: 0.2 mMol *Adenosin-5'-phosphat*, *Monotriäthylammoniumsalz* wurden durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin bei 40°/0.1 Torr wasserfrei gemacht. Zu dem zurückbleibenden harten Gummi wurden 1 ccm Pyridin und 145 mg (0.44 mMol) [2-Cyan-äthyl]- α -pyridyl-phosphat, *Cyclohexylammoniumsalz* gegeben. Die Mischung wurde geschüttelt, bis eine klare Lösung entstanden war, die im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Nach 3 Tagen wurde eine Probe der Reaktionslösung chromatographiert, der Rest mit 3 ccm 2*n* NH₄OH versetzt und zur Trockne eingengt. Der Sirup wurde bei 0° in 3 ccm 2*n* NaOH gelöst, die Lösung 30 Min. bei 0° gehalten, anschließend mit 3 ccm Wasser verdünnt und mit Merck I Ionenaustauscher (H⁺-Form) neutralisiert. Bei Erreichen des Neutralpunktes wurde sofort mit 2*n* NH₄OH alkalisch gemacht, vom Ionenaustauscher abfiltriert und dieser gründlich mit Wasser gewaschen. Waschlöslichkeit und Filtrat wurden vereinigt und auf ein kleines Vol. eingengt. Eine kleine Probe dieser Lösung wurde ebenfalls papierchromatographisch untersucht, der Rest auf eine DEAE-Cellulosesäule (3 × 40 cm, Hydrogencarbonatform) aufgegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, bis die UV-Absorption des Waschwassers bei 253 m μ vernachlässigbar war. Dann erfolgte Elution mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3 l 0.33 *m* [(C₂H₅)₃NH]HCO₃ im Vorratsgefäß, 3 l Wasser im Mischgefäß). Es wurden 25-ccm-Frak-

⁸⁾ V. Mittel., siehe l. c.¹⁾.

⁹⁾ IV. Mittel.: W. KAMPE, Chem. Ber. 98, 1031 [1965].

tionen (je 20 Min.) gesammelt. *Adenosin-5'-diphosphat* war in den Fraktionen 92–128 enthalten. Ausb. 1850 OD (Optical Density)-Einheiten ($259 \text{ m}\mu$) = 0.12 mMol (60%).

Auswertung der entwickelten Papierchromatogramme: Die Substanzen wurden unter UV-Licht ($257 \text{ m}\mu$) lokalisiert, die Flecken ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Konzentrationen wurden UV-spektroskopisch bestimmt. Außerdem bestimmte man die Mengen nach der oben beschriebenen alkalischen Hydrolyse bei 0°.

	Ausb.	
	Reaktionslösung	alkal. Hydrolyse
Adenosin-5'-phosphat	27%	27%
Adenosin-5'-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	60%	—
Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	13%	13%
Adenosin-5'-diphosphat	—	60%

Uridin-5'-diphosphat: 0.2 mMol *Uridin-5'-phosphat*, *Monotriäthylammoniumsalz* wurden durch mehrfaches Abdestillieren von Pyridin bei 40°/0.1 Torr wasserfrei gemacht. Den zurückbleibenden zähen Gummi löste man in 0.5 ccm Pyridin und gab 145 mg (0.44 mMol) [*2-Cyan-äthyl*]- α -pyridyl-phosphat, *Cyclohexylammoniumsalz* zu. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung, wie oben beschrieben, aufgearbeitet.

	Ausb.	
	Reaktionslösung	alkal. Hydrolyse
Uridin-5'-phosphat	30%	30%
Uridin-5'-diphosphat	—	60%
Uridin-5'-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	60%	—
Uridin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	10%	10%

Cytidin-5'-diphosphat: 0.2 mMol *Cytidin-5'-phosphat*, *Monotriäthylammoniumsalz* wurden durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin bei 40°/0.1 Torr wasserfrei gemacht. Zu dem zurückbleibenden harten Gummi wurden 1 ccm Pyridin und 145 mg (0.44 mMol) [*2-Cyan-äthyl*]- α -pyridyl-phosphorsäure, *Cyclohexylammoniumsalz* gegeben. Nach kurzem Schütteln entstand eine klare Lösung, die 4 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie für Adenosin-5'-diphosphat beschrieben.

	Ausb.	
	Reaktionslösung	alkal. Hydrolyse
Cytidin-5'-phosphat	12%	12%
Cytidin-5'-diphosphat	—	62%
Cytidin-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	62%	—
Cytidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	26%	26%

R_F-Werte von Phosphorsäureestern

Adenosin-5'-phosphat	0.16
Adenosin-5'-diphosphat	0.10
Adenosin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.50
Adenosin-5'-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	0.30
Cytidin-5'-phosphat	0.15
Cytidin-5'-diphosphat	0.10
Cytidin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.42
Cytidin-5'-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	0.30
Uridin-5'-phosphat	0.14
Uridin-5'-diphosphat	0.10
Uridin-5'-phosphorsäure- α -pyridylester	0.46
Uridin-5'-diphosphorsäure- <i>P</i> ² -[2-cyan-äthylester]	0.27
[2-Cyan-äthyl]- α -pyridyl-phosphat	0.75