

Friedrich Cramer, Siegbert Rittner, Walter Reinhard und Prahlad Desai

Imidoester, VIII¹⁾

Darstellung von Phosphorsäureestern mit Dimethylformamidchlorid

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt und dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

(Eingegangen am 4. September 1965)

■
Dimethylformamidchlorid (**1**) ist zur Darstellung von Diestern der Orthophosphorsäure und Pyrophosphorsäure sowie von Nucleotidestern geeignet. 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphorsäure (**2**) liefert mit 5'-O-Trityl-thymidin (**3**) in Gegenwart von **1** die entsprechende Dinucleosid-phosphorsäure **4**. **1** eignet sich auch zur Darstellung von Oligonucleotiden. Der Reaktionsmechanismus wird diskutiert.

■
Im Rahmen unserer Arbeiten über Reagenzien zur Phosphatübertragung¹⁻³⁾ haben wir auch das Dimethylformamidchlorid (**1**) untersucht⁴⁾, nachdem es in Anlehnung an Arbeiten von Zollinger⁵⁾ durch Arnold⁶⁾ als Reagenz zur Peptidsynthese verwendet worden war. Bei Modellversuchen fanden wir, daß aus Phosphorsäure-monophenylester mit diesem Reagenz Phosphorsäure-diester bei Raumtemp. schon innerhalb von 10 Minuten zu etwa 60% gebildet wurden.

Ähnlich schnell, jedoch mit geringerer Ausbeute, verlief die Knüpfung der Internucleotidbindung zwischen 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphorsäure (**2**) und 5'-O-Trityl-thymidin (**3**) mit **1** als Kondensationsmittel. Mit einem 2,5-fachen Überschuß an **1** bildete sich innerhalb von 15 Min. 25% Phosphorsäure-3',5'-dithymidylester (TpT) (**4**). Nach 36 Std. betrug die Ausbeute 41,5%. Wurde bei der Dinucleosid-phosphorsäure-Synthese ein höherer Überschuß an **1** verwendet, so führte die Reaktion zu gefärbten Nebenprodukten, eine Steigerung der Ausbeute an **4** wurde jedoch nicht erreicht. Mit vergleichbaren Ausbeuten verliefen die Polymerisationsversuche der 5'-Nucleotide zu Oligonucleotiden.

Das Pyridiniumsalz der Thymidin-5'-phosphorsäure läßt sich mit **2** (Pyridiniumsalz) und **1** zu Oligothymidylsäuren **5** umsetzen, wobei etwa 20% Oligothymidylsäuren mit einem Polymerisationsgrad größer als vier erhalten wurden. Der maximale Polymerisationsgrad betrug neun.

¹⁾ VII. Mitteil.: F. Cramer und G. Weimann, Chem. Ber. **94**, 996 (1961).

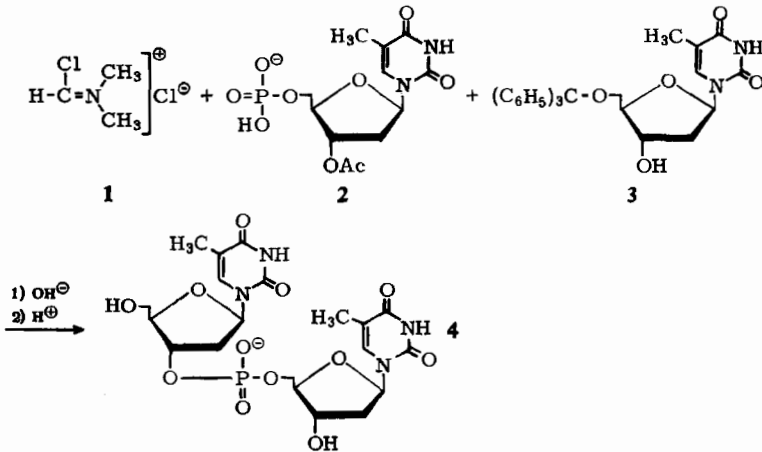
²⁾ F. Cramer und M. Winter, Chem. Ber. **94**, 989 (1961).

³⁾ F. Cramer, R. Wittmann, K. Daneck und G. Weimann, Angew. Chem. **75**, 92 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. **2**, 43 (1963).

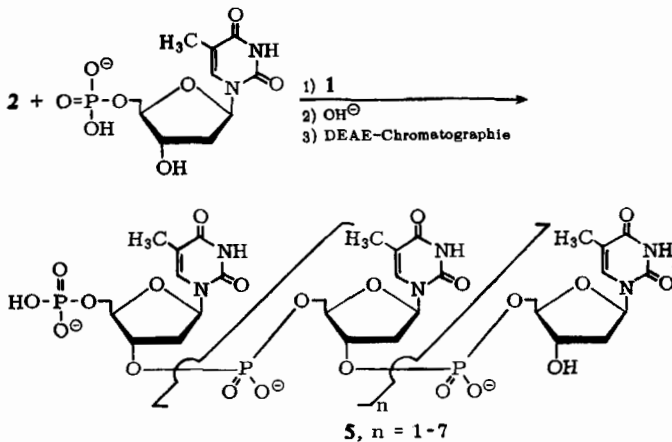
⁴⁾ S. Rittner, Diplomarb., Techn. Hochschule Darmstadt 1962.

⁵⁾ H. H. Bosshard, R. Mory, M. Schmid und H. Zollinger, Helv. chim. Acta **42**, 1659 (1959).

⁶⁾ M. Zaoral und Z. Arnold, Tetrahedron Letters [London] **1960**, 9.

Dinucleosid-phosphorsäure-Synthese⁷⁾

Polynucleotid-Synthese



Diskussion des Reaktionsmechanismus

Während die Versuche zur Isolierung von Addukten aus DMF und Säurechloriden oft erfolgreich waren⁸⁻¹¹⁾, gelang die Isolierung von Carbimidoylphosphorsäuren (6, 7) nur in einigen Fällen^{12,13)}.

7) Inzwischen haben auch über diese Synthese berichtet: *H. G. Khorana* und *T. M. Jacob*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1630 (1964); *M. Ikehara* und *H. Umo*, *Chem. Pharmac. Bull. [Tokyo]* **12**, 742 (1964).

8) *H. Bredereck*, *R. Gomper*, *H. Remper*, *K. Klemm* und *H. Keck*, *Chem. Ber.* **92**, 833 (1959).

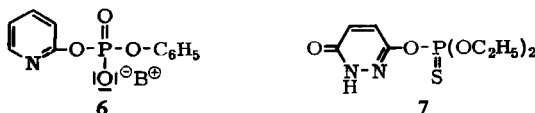
9) *K. H. Hall*, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2719 (1956).

10) *E. Kühle*, *Angew. Chem.* **74**, 861 (1962); *Angew. Chem. internat. Edit.* **1**, 647 (1962).

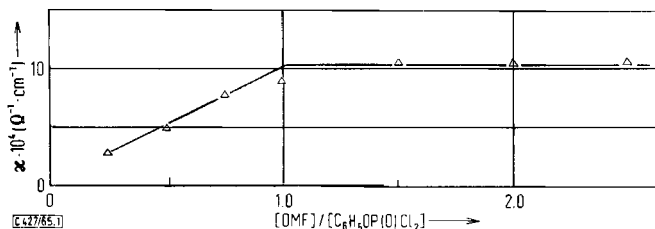
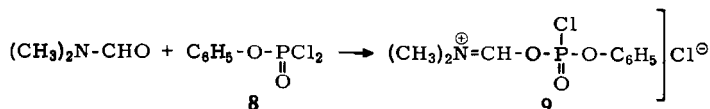
11) *H. Gold*, *Angew. Chem.* **72**, 956 (1960).

12) *W. Kampe*, *Angew. Chem.* **75**, 641 (1963); *Angew. Chem. internat. Edit.* **2**, 479 (1963).

13) *K. Szabo* und *E. Oswald*, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* **15**, 1 (1958), *C. A.* **53**, 5276 e (1959).

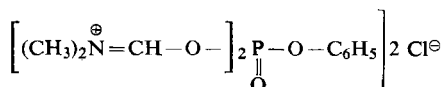


Wir konnten durch Leitfähigkeitstitrationen in Acetonitril zeigen, daß DMF mit Phosphorsäure-phenylester-dichlorid (**8**) einen definierten Komplex **9** im Molverhältnis 1:1 bildet (vgl. Abbild. 1).



Abbild. 1. Komplexbildung aus äquimolekularen Mengen DMF und Phosphorsäure-phenylester-dichlorid. (Das Abweichen der Messpunkte in der Nähe des Äquivalenzpunktes wird bei konduktometrischen Titrationen oft beobachtet¹⁴⁾)

Außerdem konnte durch Leitfähigkeitstitrationen die Existenz der bisher noch nicht beschriebenen 1:1-Komplexe des Phosphorsäure-phenylester-dichlorids mit *N*-Methyl-pyrrolidon-(2) und mit Dimethylsulfoxid nachgewiesen werden¹⁵⁾. Da die Leitfähigkeit der Lösung von DMF und Phosphorsäure-phenylester-dichlorid in Acetonitril bei einem Molverhältnis von 1:1 bereits 87% der Gesamtleitfähigkeitssteigerung erreicht, ist auf eine starke Tendenz zur Komplexbildung zu schließen. Die Komplexbildung ist durch den Energiegewinn bei der Bildung einer P—O-Bindung aus einer P—Cl-Bindung zu erklären (mittlere Bindungsenergie einer P—O-Bindung 115 kcal/Mol; einer P—Cl-Bindung 80 kcal/Mol¹⁶⁾). Da bei Zugabe von weiterem DMF zu der Lösung des 1:1-Komplexes **9** die Leitfähigkeit nur noch unwesentlich steigt (vgl. Abbild. 1), ist der Ersatz des zweiten, homöopolar gebundenen Chloratoms des Phosphorsäure-monophenylester-dichlorids durch ein zweites DMF-Molekül auszuschließen. Vermutlich ist der Komplex wegen der zweifachen positiven Ladung in



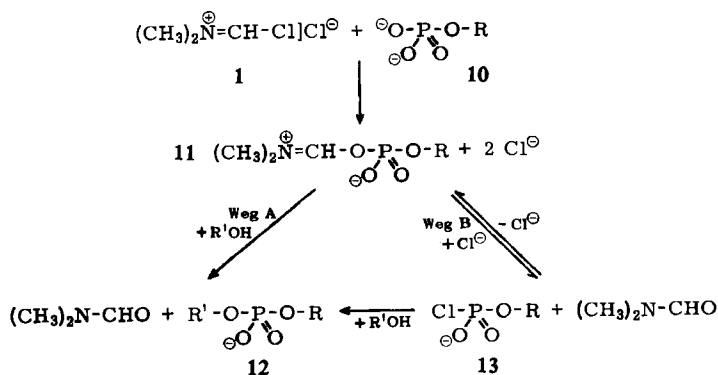
Acetonitril nicht mehr stabil. Sterische Gründe für die Nichtexistenz des 2:1-Komplexes sind unwahrscheinlich.

¹⁴⁾ K. E. Slevogt und Ilchner-Gensch, Einführung in die konduktometrische Maßanalyse, S. 11, Selbstverlag Weilheim/Obb. 1952.

¹⁵⁾ W. Reinhard, Dissertat., Univ. Heidelberg 1964.

¹⁶⁾ H. Bredereck, R. Gomper, K. Klemm und H. Rempfer, Chem. Ber. **92**, 837 (1959).

Da offenbar im Komplex **9** das zweite Chloratom nicht gleichzeitig mit dem ersten aktiviert werden kann, liegt der Vergleich der beiden Carbimidoylphosphorsäuren **9** und **11** nahe. Wir nehmen deshalb an, daß bei der Umsetzung von Dimethylformamidchlorid (**1**) mit Phosphorsäure-monoestern (**10**) und Alkoholen die Reaktion weitgehend entsprechend dem nachstehend formulierten Reaktionsweg A abläuft. Dafür spricht, daß der Komplex **9** mit Alkoholen schneller reagiert als das entsprechende Phosphorsäure-ester-chlorid^{2,15}). Gegen den als Alternative formulierten Reaktionsweg B spricht, daß bei der Bildung des Phosphorsäure-ester-chlorids **13** aus der Formimidoylphosphorsäure **11** eine P—O-Bindung zugunsten einer P—Cl-Bindung gespalten würde, was nach den erwähnten Überlegungen *Brederecks*¹⁶) energetisch ungünstig ist. Außerdem sollte in Analogie zu der Reaktion von DMF mit Phosphorsäure-ester-dichloriden das Gleichgewicht zwischen der Formimidoylphosphorsäure (**11**) und dem Phosphorsäure-ester-monochlorid (**13**) weitgehend auf der Seite der Formimidoylphosphorsäure liegen. Daneben ist die Bildung von monomerer oder trimerer Metaphosphorsäure aus **11** möglich, die dann ihrerseits mit dem Alkohol zu Phosphorsäure-diestern (**12**) weiterreagieren könnte.



Wir danken Herrn Dr. *K. Daneck* für Vergleichsproben authentischer Oligothymidylsäuren.

Beschreibung der Versuche

1. *Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Phosphorsäure-diestern (Cyclohexylammoniumsalze)*: Zu 174 mg (1.00 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* in 10 ccm Pyridin wurden in einem mit Stickstoff gefüllten Trockenkasten 1270 mg (10.0 mMol) frisch hergestelltes *Dimethylformamidchlorid* (**1**) gegeben und nach 15 Min. 5 mMol des entsprechenden *Alkohols* zuge tropft. Nach 24 Std. bei Raumtemperatur wurde bei 40°/16 Torr auf einen kleinen Rückstand eingeeengt, mit 10-proz. Schwefelsäure angesäuert, fünfmal mit Äther extrahiert, die äther. Phase nochmals stark eingeeengt und danach mit 10 ccm Acetonitril und 0.8 ccm *Cyclohexylamin* versetzt. Nach mehrtägigem Aufbewahren in der Kühltruhe wurde das kristalline Produkt abgesaugt und aus Acetonitril umkristallisiert (Ausbeuten s. Tab. 1).

Tab. 1. Aus Phosphorsäure-monoestern, Alkohol und Dimethylformamidchlorid (1) erhaltene Phosphorsäure-diester

ROPO ₃ H ₂ R (mg)	R'OH (mg)	RO—P(O)(OH)—OR' (Cyclohexylammoniumsalze)			R _F -Werte im Laufmittel A *)
		% Ausb.	Lit.-Schmp.	Schmp.	
C ₆ H ₅ (174)	CH ₃ OH (160)	75	150—152° ¹⁾	150—152°	0.59
C ₆ H ₅ (174)	C ₂ H ₅ OH (230)	56	114—116° ¹⁾	116—117°	0.64
C ₆ H ₅ (174)	(CH ₃) ₂ CHOH (300)	68	157—159° ^{4,17)}	157—159°	0.70
C ₆ H ₅ (174)	(CH ₃) ₃ COH (2200)	40	177—180° ⁴⁾	177—180°	0.75
C ₆ H ₅ (174)	C ₆ H ₅ CH ₂ OH (1270)	80	146—148° ¹⁾	140—142°	0.74

*) Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (8:1:1) auf Whatman Nr. 3MM Papier, absteigend.

Phosphorsäure-isopropylester-phenylester (Cyclohexylammoniumsalz): Schmp. (Acetonitril) 157—160°.

C₁₅H₂₆NO₄P (315.1) Ber. P 9.86 Gef. P 9.78

2. *Phosphorsäure-tert.-butylester-phenylester* (Cyclohexylammoniumsalz): Zu 174 mg (1.00 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* in 10 ccm Pyridin gab man 1270 mg (10.0 mMol) frisch hergestelltes **1** und 2200 mg (30 mMol) *tert.-Butylalkohol*. Nach 60 Stdn. bei 40° wurde analog **1**. aufgearbeitet (s. Tab. 1.). Schmp. (Acetonitril) 177—180°.

C₁₆H₂₈NO₄P (329.1) Ber. P 9.4 Gef. P 9.0

3. *Pyrophosphorsäure-P.P'-diphenylester* (Dicyclohexylammoniumsalz): Die Mischung aus 1.74 g (10 mMol) *Phosphorsäure-monophenylester* in 10 ccm absol. Acetonitril und 2.0 ccm *Triäthylamin* in 5 ccm Acetonitril ließ man zu einer Lösung von 2.56 g (20 mMol) **1** und 15 ccm Acetonitril tropfen und rührte 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Mit einer Lösung von 3 ccm *Cyclohexylamin* in 5 ccm Acetonitril wurde das *Pyrophosphat* gefällt, dann abgesaugt und aus Wasser, unter Zusatz von wenig Pyridin, umkristallisiert. Ausb. 69%, Schmp. 255 bis 258° (Lit.¹⁸⁾: 255—258°).

4. *Pyrophosphorsäure-P.P'-bis-[4-chlor-phenylester]* (Dicyclohexylammoniumsalz): Herstellung analog 3., Ausb. 70%, Schmp. 276—279° (Lit.¹⁸⁾: 276—279°).

5. *Adenosin-5'-[phosphorsäure-methylester]*: Zu 694 mg (2.00 mMol) *Adenosin-5'-phosphorsäure* in 0.71 g *Tri-n-octylamin* und 20 ccm DMF wurde die Lösung von 2 g **1** in 10 ccm DMF getropft. Nach 5 Min. ließ man 5 ccm *Methanol* tropfenweise zulaufen. Schon nach 10 Min. Reaktionszeit konnte papierchromatographisch der Nucleotidester nachgewiesen werden. Man ließ über Nacht bei Raumtemperatur rühren und setzte nochmals 0.5 g **1** in 5 ccm DMF und nochmals 3 ccm *Methanol* zu. Nach weiteren 12 Stdn. wurde die mit Ammoniak neutralisierte Lösung i. Hochvak. eingengt und mit Äther gefällt, die Fällung in wenig *Methanol* gelöst und auf Whatman Nr. 3 MM Papier mit Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (7:1:2) absteigend chromatographiert. Die Zonen mit den R_F-Werten 0.35 wurden ausgeschnitten

¹⁷⁾ F. L. Maklyaev, M. I. Druzyn, I. V. Palagina, R. Ya. Aleksandrova, V. K. Prokhodtseva und R. A. Khamidulina, Shurnal Obschtschei Chimii, C. A. 58, 8887 g (1963); Phosphorsäure-isopropylester-phenylester Sdp._{0,4} 95°.

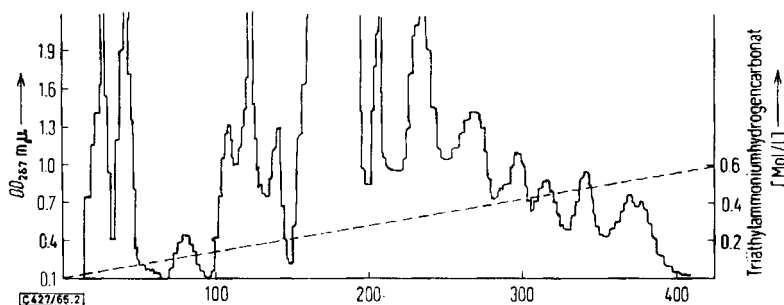
¹⁸⁾ F. Cramer und R. Wittmann, Chem. Ber. 94, 328 (1961).

und mit Methanol eluiert, das Eluat konzentriert und mit Aceton/Äther gefällt. Ausb. an chromatographisch reinem *Adenosin-5'-[phosphorsäure-methylester]* 37%. Der R_F -Wert stimmt mit den Literaturangaben überein ¹⁹⁾.

6. *Adenosin-5'-[phosphorsäure-benzylester]*: Herstellung analog 5., Ausb. 26%. Der R_F -Wert entspricht innerhalb der Fehlergrenzen den Literaturangaben (R_F 0.70 ¹⁹⁾).

7. *Thymidin-3'-[phosphorsäure-5'-thymidylester]* (4): 0.1 mMol *3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphorsäure* (2) (Pyridiniumsalz) wurden mit 0.1 mMol *5'-O-Trityl-thymidin* (3) versetzt und i. Hochvak. bei etwa 25° zur Trockene eingedampft. Spuren von Wasser wurden mit absol. Pyridin entfernt, indem man dreimal mit je 10 ccm absol. Pyridin i. Hochvak. zur Trockene eindampfte. Der Rückstand wurde in 1 ccm absol. Pyridin gelöst und ein 2.5-facher molarer Überschuß an 1 in 0.5 ccm absol. Acetonitril zugegeben. Nach 36 Stdn. bei Raumtemperatur und Ausäthern des Harnstoffs wurden die Schutzgruppen mit 2*n* NaOH und 80-proz. Essigsäure (10 Min. bei 100°) abgespalten. Ausb. 41.5% (spektrophotometrisch). Der R_F -Wert entspricht innerhalb der Fehlergrenzen den Literaturangaben (R_F 0.38) ²⁰⁾.

8. *Polymerisation von Thymidin-5'-phosphorsäure*: 2.7 mMol *Thymidin-5'-phosphorsäure* (Pyridiniumsalz) in 1.5 ccm absol. Pyridin wurden mit 5.9 mMol 1 in 1 ccm absol. Acetonitril voraktiviert. Nach 10 Min. gab man 0.9 mMol *3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphorsäure* (2) (Pyridiniumsalz) in 0.3 ccm Pyridin zu und schüttelte in einem lichtgeschützten Kolben 7 Tage. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ccm 20-proz. Pyridin abgebrochen und die Mischung 6 Stdn. sich selbst überlassen. Nach Eindampfen i. Hochvak. und Abspalten der Acetylenschutzgruppe mit 10 ccm 0.3*n* NaOH (30 Min.) wurde mit Ionenaustauscher Merck I (Pyridiniumform) neutralisiert und das Filtrat nochmals über eine Ionenaustauschersäule Merck I (Pyridiniumform) gegeben. Ein aliquoter Anteil des stark eingeeengten Filtrates wurde an einer DEAE-Cellulose-Ionenaustauschersäule (linearer Gradient 0.0 bis 0.6 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat) chromatographiert (Abbild. 2). Die einzelnen Fraktionen wurden chromatographisch gereinigt (Papier: Whatman 3 MM; Laufmittel Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser 55:10:35). Durch Vergleich mit definierten Oligothymidylsäuren stellten wir fest, daß Oligonucleotide mit einer maximalen Kettenlänge von 9 Nucleotideinheiten entstanden waren. Etwa 20% der synthetisierten Oligothymidylsäuren bestanden aus mehr als vier Nucleotideinheiten.



Abbild. 2. Elutionsdiagramm der Oligothymidylsäuren. (Das Diagramm entspricht einer Grobtrennung; die peaks enthalten in geringer Menge noch homologe Oligothymidylsäuren)

19) K. Daneck, Diplomarb., Techn. Hochschule Darmstadt 1962.

20) F. Cramer und T. Hata, Liebigs Ann. Chem. 692, 22 (1966).

Tab. 2. Papierchromatographie

Verbindung	R_F -Werte im Lösungsmittelsystem*)			
	A	B	C	D
Anorg. Phosphorsäure	0.0			
Phosphorsäure-monophenylester	0.10			
Pyrophosphorsäure- <i>P.P'</i> -diphenylester	0.45			
Pyrophosphorsäure- <i>P.P'</i> -bis-[4-chlor-phenylester]	0.56			
Thymidin		0.70		
Thymidin-5'-phosphorsäure		0.15	0.20	
3'- <i>O</i> -Acetyl-thymidin-5'-phosphorsäure (2)			0.63	
5'- <i>O</i> -Trityl-thymidin (3)		0.87		
Phosphorsäure-3'.5'.5'-dithymidylester (4)		0.41		
Pyrophosphorsäure- <i>P.P'</i> -[dithymidylester-(5'.5')]		0.22		
Adenosin-5'-phosphorsäure				0.35
Adenosin-3'.5'-cyclophosphorsäure				0.57
Adenosin-5'-[phosphorsäure-methylester]				0.45
Adenosin-5'-[phosphorsäure-benzylester]				0.65
Pyrophosphorsäure- <i>P.P'</i> -[diadenosylester-(5'.5')]				0.22
Lösungsmittelsystem	A: Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (8:1:1), B: Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (7:1:2), C: Äthanol/Wasser (5:2), Lösungsmittelsystem A—C: Papier: Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen, D: Isopropylalkohol/1% gesätt. Ammoniumsulfat (2:1), Papier: Binzer-Ederol 202, getränkt mit Ammoniumsulfat.			

Leitfähigkeitsmessungen

Man verwendete einen WTW-Leitfähigkeitsmesser (Typ LBR) sowie platierte Elektroden (Typ LTA). Der Meßfehler des Gerätes beträgt $\pm 1\%$. Die Meßwerte sind sehr gut reproduzierbar. Widerstände bis einschließlich 1000 Ohm wurden bei einer Wechselstromfrequenz von 30 kHz gemessen, größere Widerstände bei einer Frequenz von 50 Hz.

Als Leitfähigkeitszelle wurde ein Saugreagenzglas verwendet, dessen Innendurchmesser nur wenig größer war als der Durchmesser der Tauchelektrode, mit der auch die Lösungen durchmischt wurden. Zur Verhinderung der Hydrolyse der Säurechloride durch Luftfeuchtigkeit wurde ein kräftiger, getrockneter Stickstoff-Strom durch die Zelle geblasen. Daß diese Improvisation völlig ausreichend war, beweist die zeitliche Konstanz der Endleitfähigkeitswerte des Komplexes aus Phosphorsäure-phenylester-dichlorid und DMF. Die Messungen wurden in einem Wasserbad-Thermostaten bei 21.0° durchgeführt.

Zu je 5.0 ccm (V_0) einer 0.075 *m* Lösung von Phosphorsäure-phenylester-dichlorid in Acetonitril werden 0.25, 0.50, 0.75 und 1.00 ccm einer 0.375 *m* DMF-Lösung in Acetonitril zugesetzt. Der durch das Volumen der zugesetzten Maßlösung (V_x) verfälschte Widerstand $R_{(V_0 + V_x)}$ wird nach folgender Formel korrigiert²¹⁾:

$$R_{(V_0)} = R_{(V_0 + V_x)} \frac{V_0}{V_0 + V_x}$$

Da diese Korrektur nur für kleine Volumenänderungen gilt, wurden höhere Konzentrationen direkt eingewogen. Die zeitliche Konstanz der Meßwerte wurde mehrmals überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbild. 1 dargestellt.

21) Th. Shedlovsky, in A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, 3rd Edition, Vol. I, Part IV, Interscience Publishers, New York 1960. [427/65]