

CHEMISCHE BERICHTE

In Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

herausgegeben von der

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

101. Jahrg. Nr. 4

S. 1141—1524

Karl-Heinz Scheit

Die Synthese von 4-Thiouridin-5'-diphosphat, 4-Thiouridin-5'-triphosphat und Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 13. Oktober 1967)

Durch Reaktion von 2'.3'-*O*-Äthoxymethylen-4-thiouridin (4) und 3'-*O*-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin (11) mit Triimidazolylphosphinoxid wurden nach milder alkalischer Hydrolyse 2'.3'-*O*-Äthoxymethylen-4-thiouridin-5'-phosphorsäure-imidazolid (6) bzw. 3'-*O*-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin-5'-phosphorsäure-imidazolid (12) erhalten. Deren Reaktion mit Phosphat oder Pyrophosphat führte nach Abspaltung der Schutzgruppen zu 4-Thiouridin-5'-diphosphat, -triphosphat und Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat (7, 8 und 13).

t-RNS von *E. coli* enthält in geringen Mengen das Nucleosid 4-Thiouridin²⁾, über dessen Funktion und Eigenschaften noch keine Klarheit herrscht. Als uns kürzlich mit Hilfe der NMR-Spektroskopie der Nachweis einer Assoziation zwischen Adenosin und 4-Thiouridin³⁾ in inertem Lösungsmittel gelungen war, ergab sich nun die Frage nach den Eigenschaften von 4-Thiouridin in Polynucleotiden. Daher beabsichtigten wir die enzymatische Synthese von Polynucleotiden, die 4-Thiouridin enthalten. Als Substrate dafür wurden 4-Thiouridin-5'-diphosphat und -triphosphat benötigt.

Für die Synthese von Desoxy-4-thiothymidin-Polynucleotiden war die Darstellung von Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat erforderlich. Im folgenden berichten wir über die Darstellung der genannten Verbindungen.

Den Schwefel führten wir nach Fox et al.⁴⁾ durch Kochen der entsprechenden Uridin-Verbindung mit Phosphor(V)-sulfid in Pyridin ein. Ausgehend von 5'-*O*-Acetyl-

1) Vorgetragen am 9. 9. 1967 auf dem XXI. Kongreß für reine und angewandte Chemie, Prag, CSSR.

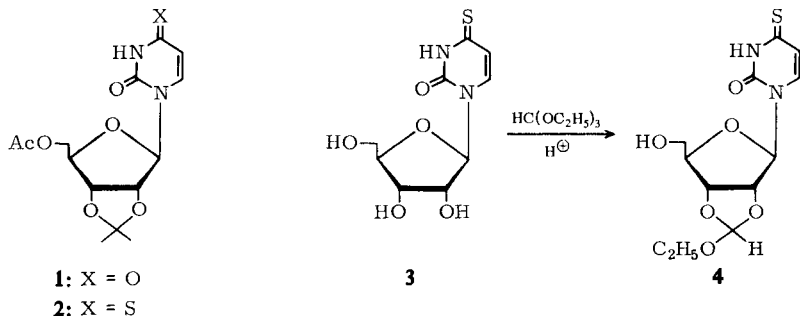
2) M. N. Lipsett, J. biol. Chemistry **240**, 3975 (1965).

3) K. H. Scheit, Angew. Chem. **79**, 190 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. **6**, 180 (1967).

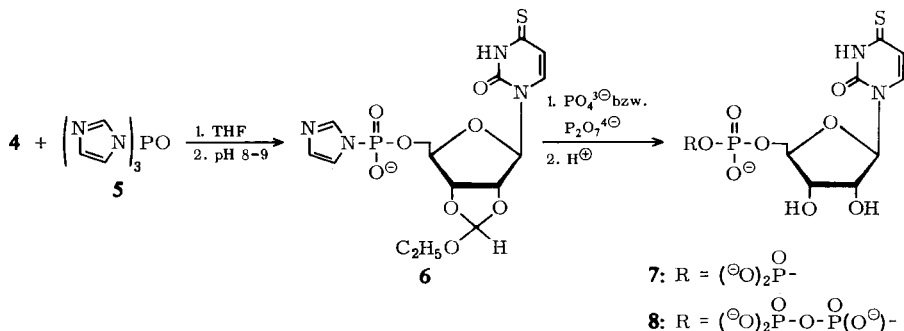
4) J. J. Fox, D. van Praag, I. Wempen, I. L. Doerr, L. Cheong, J. E. Knoll, M. L. Eidinoff, A. Bendich und G. B. Brown, J. Amer. chem. Soc. **81**, 178 (1959).

2'.3'-*O*-isopropyliden-uridin (**1**) erhielten wir nach Säulenchromatographie an Silicagel in 45proz. Ausbeute das 4-Thiouridin-Derivat **2** als kristalline Substanz. Hydrolyse durch konz. wäßrigen Ammoniak, gefolgt von 50proz. Essigsäure, führte zu 4-Thiouridin (**3**).

In Gegenwart katalytischer Mengen Säure reagierte **3** glatt mit Orthoameisensäure-triäthylester zu 2'.3'-*O*-Äthoxymethylen-4-thiouridin (**4**), welches als Ausgangsmaterial für die Darstellung der Polyphosphate dienen sollte.



Für die Synthese von Nucleosid-5'-polyphosphaten benutzt man im allgemeinen Nucleosid-5'-phosphorsäure-imidazolide⁵⁾ oder -morpholide⁶⁾, bereitet durch Reaktion des Nucleotids mit Carbonyldiimidazol bzw. Morpholin und Dicyclohexylcarbodiimid. Auf diese Weise gelang *Kochetkov* et al. die Darstellung von 4-Thiouridin-5'-phosphorsäure-morpholid⁷⁾. Wesentlich eleganter ist dagegen die Phosphorylierung eines entsprechend geschützten Nucleotids mit Triimidazolylphosphinoxid (**5**)⁸⁾, welche nach milder Hydrolyse bei pH 8–9 direkt zu Nucleosidphosphorsäure-imidazoliden führt. So erhielten wir ausgehend von **4** das Imidazolid **6** in 50proz. Ausbeute. **6** reagierte mit Tris-tributylammonium-phosphat zu dem entsprechenden Nucleosid-5'-diphosphat (**7**), das nach Hydrolyse der Äthoxymethylengruppe und Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose in 50proz. Ausbeute isoliert wurde. Analog erhielten wir 4-Thiouridin-5'-triphosphat (**8**) in 40proz. Ausbeute.



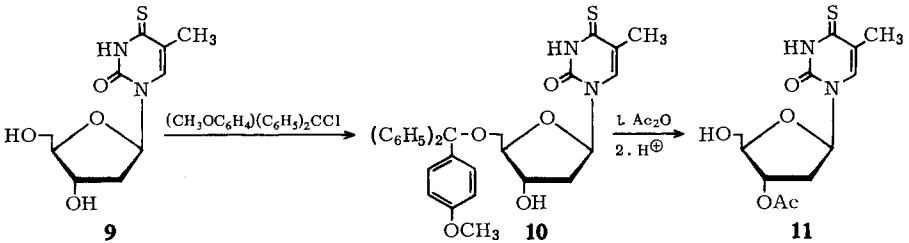
⁵⁾ F. Cramer und H. Neunhoeffer, Chem. Ber. **95**, 1664 (1962).

⁶⁾ J. G. Moffat, Canad. J. Chem. **42**, 599 (1964).

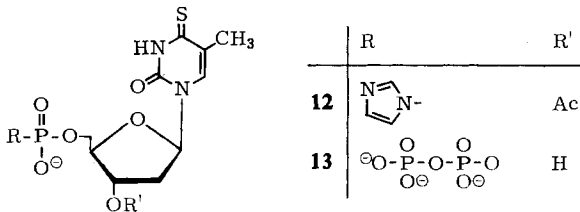
⁷⁾ N. K. Kochetkov, E. I. Budowskij, W. N. Schibajew und M. A. Gratschew, Ber. Akad. Wiss. UdSSR, chemische Reihe **9**, 1592 (1963), C. **1966**, 18-1069.

⁸⁾ F. Eckstein und H. Gindl, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam], im Druck.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung von Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat (13) benutzten wir 3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin (11), das wir auf folgendem Weg bereiteten.



Reaktion von 11 mit Triimidazolylphosphinoxid führte nach milder alkalischer Hydrolyse zum Imidazolid 12 (50% Ausb.) und dieses mit Tris-tributylammoniumpyrophosphat in Dimethylsulfoxid zu 3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat. Nach ammoniakalischer Hydrolyse wurde 13 durch Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose in 50proz. Ausbeute isoliert.



Die dargestellten Nucleosid-5'-polyphosphate wurden durch Papierchromatographie, Papierelektrophorese und Phosphatanalyse charakterisiert.

Prof. Dr. F. Cramer sei für die wohlwollende Unterstützung, Fräulein D. Tomars für fleißige und geschickte Mitarbeit gedankt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte diese Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

UV-Spektren wurden mit den Geräten Zeiss PMQ II und Cary 14 aufgenommen. Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Fa. Reichert, Österreich) bestimmt und sind nicht korrigiert. Für die Säulenchromatographie wurde ein LKB-Fraktionssammler mit Uvicord-Analysator benutzt.

Phosphoranalysen: nach der Methode von Chen et al.⁹⁾ Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen), Äthanol/1 m CH₃CO₂NH₄ (5:2) (A).

Papierelektrophorese: In 0.1 m [(C₂H₅)₃NH]HCO₃, pH 7.5, auf Whatman 3 MM-Papier bei 17 Volt/cm.

Dünnschichtchromatographie: Lösungsmittel: Chloroform/Methanol 97:3 (B), 95:5 (C); Butanol, gesättigt mit Wasser (D). Es wurden Silicagel F₂₅₄-Dünnschichtplatten (E. Merck AG) für analytische und Silicagel PF₂₅₄ (E. Merck AG) für präparative Zwecke benutzt.

⁹⁾ P. S. Chen, T. Y. Toribara und H. Warner, Analytic. Chem. **28**, 1756 (1956).

Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese

	Lösungsmittelsystem				Elektrophorese
	A	B	C	D	
5'-O-Acetyl-2',3'-O-isopropyliden-uridin (1)			0.63		
5'-O-Acetyl-2',3'-O-isopropyliden-4-thiouridin (2)		0.88			
4-Thiouridin (3)				0.75	
2',3'-O-Äthoxymethylen-4-thiouridin (4)			0.70		
2',3'-O-Äthoxymethylen-4-thiouridin-5'-phosphorsäure-imidazolid (6)					1.75*)
4-Thiouridin-5'-diphosphat (7)	0.17				
4-Thiouridin-5'-triphosphat (8)	0.15				
3',5'-Di-O-acetyl-desoxy-4-thiothymidin		0.90			
Desoxy-4-thiothymidin (9)			0.20	0.79	
5'-O-Methoxytrityl-desoxy-4-thiothymidin (10)		0.38			
3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin (11)					
3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin-5'-phosphorsäure-imidazolid (12)					1.92**)
Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat (13)	0.18				
Uridin-5'-phosphat					2.40*)

*) Bezogen auf 4.

**) Bezogen auf 11.

5'-O-Acetyl-2',3'-O-isopropyliden-4-thiouridin (2): 10 mMol 5'-O-Acetyl-2',3'-O-isopropyliden-uridin (1) und 20 mMol (5.62 g) P_2S_5 wurden in 95 ccm Pyridin und 1 ccm Wasser 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen wurde von abgedampftem Öl dekantiert, mit 100 ccm Wasser versetzt, 30 Min. stehengelassen, die Lösung danach zur Trockne eingengt und der Rückstand, an wenig Kieselgel absorbiert, auf eine Kieselgelsäule (70 × 4.5 cm) gebracht. Nach Elution mit Chloroform/Methanol (95 : 5) engte man die Fraktionen, welche das gelbe Produkt enthielten, zur Trockne ein und kristallisierten den Rückstand aus Äthanol/Petroläther (40–60°). Ausb. 1.5 g (45%) chromatographisch reines Produkt (nach Trocknen über P_2O_5). Schmp. 143–144°.

$C_{14}H_{18}N_2O_6S$ (342.4) Ber. C 49.10 H 5.36 N 8.12 S 9.28

Gef. C 49.11 H 5.30 N 8.18 S 9.37

UV (Methanol): λ_{max} 329 m μ (ϵ 19.6 · 10³); 247 (4.45 · 10³); λ_{min} 275, 223 m μ .

4-Thiouridin (3): 10 mMol (3.4 g) 2 wurden in 100 ccm Dioxan/konz. Ammoniak (1 : 1) gelöst. Nach 15 Stdn. bei Raumtemp. wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand mit 100 ccm 50proz. Essigsäure 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht, das Gemisch eingengt und durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in Butanol (gesättigt mit Wasser) getrennt. Die Substanz wurde vom Kieselgel mit Methanol eluiert, das Eluat eingengt und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 2.08 g (80%) gelbe Kristalle (nach Trocknen über P_2O_5). Schmp. 139–140°.

$C_9H_{12}N_2O_5S$ (260.3) Ber. C 41.54 H 4.65 N 10.76 S 12.32

Gef. C 41.40 H 4.76 N 10.64 S 12.27

UV (Methanol): λ_{max} 330 m μ (ϵ 2.0 · 10⁴); 246 (4.79 · 10³); λ_{min} 275, 222 m μ . Wasser, pH 7: λ_{max} 330 m μ (2.1 · 10⁴); 243 (3.4 · 10³); λ_{min} 274, 225 m μ .

2'.3'-O-Äthoxymethylen-4-thiouridin (4): 10 mMol (2.6 g) **3** wurden durch Abdestillieren von Äthanol bei 0.5 Torr getrocknet, anschließend in 20 ccm DMF und 10 ccm *Orthoameisensäure-triäthylester* mit 0.4 ccm 1.4*n* HCl in DMF versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Man gab dann 200 ccm 2*n* NH₃ zu, engte nach 24 Stdn. bei Raumtemp. zur Trockne ein und trennte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in Chloroform/Methanol (98 : 2). Die erste gelbe Zone nach dem Start wurde mit Chloroform/Methanol (1 : 1) eluiert und das Eluat eingengt. Ausb. 1.9 g (66%) amorphes gelbes Pulver.

C₁₂H₁₆N₂O₆S (316.3) Ber. C 45.56 H 5.10 N 8.85 S 10.14
Gef. C 45.54 H 5.28 N 8.80 S 10.02

2'.3'-O-Äthoxymethylen-4-thiouridin-5'-phosphorsäure-imidazolid (6): Zu 48 mMol (3.27 g) *Imidazol* wurden in 40 ccm Tetrahydrofuran 8 mMol (0.73 ccm) POCl₃ in 4 ccm Tetrahydrofuran unter Rühren zugepft. Nach 15 Stdn. bei Raumtemp. wurde unter Feuchtigkeitsausschluß abgesaugt, das Filtrat zu einer Lösung von 2 mMol (0.63 g) **4** in 5 ccm DMF gegeben und die Reaktionsmischung 24 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Danach gab man 25 ccm Wasser/Triäthylamin (pH 9) zu, engte nach 2 Stdn. bei Raumtemp. ein und trennte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel zuerst mit Chloroform/Methanol (9 : 1), dann mit Äthanol/1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat (5 : 2). Die zweite gelbe Zone nach dem Start wurde, noch feucht, mit Methanol eluiert, die optische Dichte des Eluats bei 330 m μ gemessen und eingengt. Ausb. 2 · 10⁴ OD-Einheiten bei 330 m μ (ca. 50%). Die Substanz war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

Verhältnis 4-Thiouridin : P = 1 : 1.15.

UV (Wasser, pH 7): λ_{\max} 330, 243 m μ ; λ_{\min} 275, 224 m μ .

4-Thiouridin-5'-diphosphat (7): 10⁴ OD-Einheiten (330 m μ) **6**, *Triäthylammoniumsalz*, wurden durch Abdestillieren von Pyridin wasserfrei gemacht und der Rückstand in 1 ccm DMSO mit 2 mMol *Tris-tributylammonium-phosphat* in 2 ccm DMSO versetzt. Nach 30 Stdn. bei Raumtemp. wurden 50 ccm 50proz. *Essigsäure* zugegeben, 5 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen, die Essigsäure dann abdestilliert, der Rückstand mit 20 ccm verd. Ammoniak (pH 9) aufgenommen und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (60 × 4.5 cm) gebracht. Nach Waschen mit Wasser erfolgte Elution mit einem linearen Gradienten an *Triäthylammoniumhydrogencarbonat* (3 l 0.4 *m* [(C₂H₅)₃NH]HCO₃ im Vorratsgefäß, 3 l Wasser im Mischgefäß). Die 25-ccm-Fractionen, welche **7** enthielten, wurden vereinigt und bei 15^o/14 Torr zur Trockne eingedampft. Ausb. 5000 OD-Einheiten (330 m μ) = 0.25 mMol (50%).

Verhältnis 4-Thiouridin : P = 1 : 2.20.

UV (Wasser, pH 7): λ_{\max} 330, 243 m μ ; λ_{\min} 275, 224 m μ .

Das *Triäthylammoniumsalz* wurde in Methanol mit 2 mMol (0.24 g) *Lithiumtrifluoracetat* versetzt und das *Dilithiumsalz* von **7** mit Äther ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und über P₂O₅ getrocknet; amorphes Pulver.

Li₂C₉H₁₂N₂O₁₁P₂S · 12 H₂O (648.1) Mol.-Gew. Gef. 675 (UV-spektroskop.)

4-Thiouridin-5'-triphosphat (8): 10⁴ OD-Einheiten (330 m μ) *Triäthylammoniumsalz* von **6** (0.5 mMol) wurden durch Abdestillieren von Pyridin wasserfrei gemacht. Zum Rückstand in 1 ccm DMSO gab man 2 mMol *Tetrakis-tributylammonium-pyrophosphat* in 2 ccm DMSO. Reaktionsdauer, Aufarbeitung und saure Hydrolyse, wie bei **7** beschrieben. Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte an DEAE-Cellulose (Säule 60 × 4.5 cm, linearer Gradient an *Triäthylammoniumhydrogencarbonat*, 3 l 0.5 *m* [(C₂H₅)₃NH]HCO₃ im Vorratsgefäß, 3 l

Wasser im Mischgefäß). Ausb. 4000 OD-Einheiten (330 m μ) = 0.18 mMol (40%). **8** wurde analog **7** in das *Tetralithiumsalz* übergeführt.

$\text{Li}_4\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_3\text{S} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (705.0) Mol.-Gew. Gef. 720 (UV-spektroskop.)

Verhältnis 4-Thiouridin : P = 1 : 3.20.

UV (Wasser, pH 7): λ_{max} 330, 245 m μ ; λ_{min} 275, 224 m μ .

Desoxy-4-thiothymidin (**9**): 19.3 mMol (6.3 g) *3',5'-Di-O-acetyl-desoxy-thymidin* wurden in 85 ccm Pyridin, welches 0.4 ccm Wasser enthielt, mit 19.3 mMol (5.4 g) P_2S_5 (umkristallisiert aus Schwefelkohlenstoff) 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde von abgetrenntem Öl dekantiert, mit 100 ccm Wasser versetzt und 30 Min. stehengelassen. Danach wurde eingengt, der Rückstand in 200 ccm Chloroform aufgenommen, die Lösung mehrmals mit Wasser extrahiert, die Chloroformphase zur Trockne eingedampft und der Rückstand in wenig Äthanol unter Erwärmen gelöst. Nach 15 Stdn. saugte man die abgeschiedenen Kristalle von *3',5'-Di-O-acetyl-desoxy-4-thiothymidin* ab und trocknete über P_2O_5 . Ausb. 4.15 g (63%). Schmp. 97° (aus Äthanol).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (342.4) Ber. C 49.12 H 5.30 N 8.18 S 9.37
Gef. C 49.42 H 5.29 N 8.36 S 9.32

Die Lösung von 10 mMol (3.4 g) des *Diacetyl-Derivats* in 100 ccm Dioxan/konz. *Ammoniak* (1 : 1) wurde 15 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Dann wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand der präparativen Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9 : 1) unterworfen. Die erste gelbe Zone nach dem Start wurde mit Methanol eluiert. Nach Abdestillieren des Methanols kristallisierte der Rückstand beim Anreiben mit Äthanol. Ausb. 2.0 g (80%). Schmp. 127° (aus Äthanol).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (258.3) Ber. C 46.52 H 5.46 N 10.85 S 12.42
Gef. C 46.34 H 5.40 N 10.87 S 12.26

5'-O-Methoxytrityl-desoxy-4-thiothymidin (**10**): 10 mMol (2.6 g) **9** in 20 ccm *Pyridin* wurden mit 12 mMol (3.7 g) *Methoxytritylchlorid* versetzt und die klare Lösung 15 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Man gab dann 10 ccm Methanol zu, ließ 1 Stde. bei Raumtemp. stehen und dampfte zur Trockne ein. Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (97 : 3). Die erste Zone nach dem Start wurde mit Chloroform/Methanol (1 : 1) eluiert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in 10 ccm Äthanol gelöst und die Substanz durch Eintropfen in 200 ccm Petroläther (40–60°) gefällt. Nach Abzentrifugieren und Trocknen bei 40°/0.5 Torr über P_2O_5 Ausb. 2.5 g (50%) amorphes, gelbes Pulver.

$\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (504.6) Ber. C 66.65 H 5.59 N 5.55 S 6.35
Gef. C 66.40 H 5.60 N 5.70 S 6.25
Mol.-Gew. 540 (UV-spektroskop.)

3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin (**11**): 10 mMol (5.0 g) **10** wurden in 20 ccm *Pyridin* mit 3 ccm *Acetanhydrid* versetzt. Nach 15 Stdn. bei Raumtemp. wurden unter Eiskühlung 20 ccm Methanol zugefügt und zur Trockne eingengt. Restliches Pyridin entfernte man durch Abdestillieren von Wasser. Der Rückstand wurde in 200 ccm 80proz. *Essigsäure* 1/2 Stde. bei 50° gehalten. Man engte ein und isolierte **11** durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 97 : 3). Die Substanz wurde mit Chloroform/Methanol (1 : 1) vom Kieselgel eluiert und kristallisierte während des Einengens. Ausb. 2.4 g (80%). Schmp. 144° (aus Äthanol/Petroläther).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (300.3) Ber. C 47.99 H 5.38 N 9.34 S 10.69
Gef. C 47.91 H 5.41 N 9.35 S 10.56

3'-O-Acetyl-desoxy-4-thiothymidin-5'-phosphorsäure-imidazolid (12): Analog **6** ausgehend von 2 mMol (0.6 g) **11**, $2 \cdot 10^4$ OD-Einheiten (335 m μ) = 50%. Die Substanz war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

Verhältnis Desoxy-4-thiothymidin : P = 1 : 1.0.

UV (Wasser, pH 7): λ_{\max} 335, 240 m μ ; λ_{\min} 275, 232 m μ .

Desoxy-4-thiothymidin-5'-triphosphat (13): Aus 10^4 OD-Einheiten (335 m μ) **12** (0.5 mMol) analog **8**. Anstelle von 50proz. Essigsäure wurde 6 Stdn. bei Raumtemp. mit konz. *Ammoniak* hydrolysiert. Ausb. 5000 OD-Einheiten (335 m μ) = 0.25 mMol (50%). **13** wurde, wie für **7** beschrieben, in das *Tetralithiums*alz übergeführt und bei 25°/0.5 Torr über P₂O₅ getrocknet.

Verhältnis Desoxy-4-thiothymidin : P = 1 : 3.30.

Li₄C₁₀H₁₃N₂O₁₃P₃S · 10H₂O (702.1) Mol.-Gew. Gef. 710 (UV-spektroskop.)

[460/67]
