

Fritz Eckstein und Hans Gindl

Uridin-2'.3'-O.O-cyclothiophosphat

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
(Eingegangen am 1. Dezember 1967)

Die Synthese von Uridin-2'.3'-O.O-cyclothiophosphat (**3**) und Uridin-2'.3'-cyclophosphat (**4**) wird beschrieben. Die Hydrolyse von **3** im Alkalischen und Säuren wird untersucht.

Uridin-2'.3'-O.O-cyclothiophosphat (**3**) ist ein Thiophosphat-Analoges zu 5-gliedrigen cyclischen Phosphaten, deren Hydrolyse eingehend studiert worden ist¹⁾. Wir beabsichtigten, diese Verbindung als Substrat für Pankreasribonuclease zu verwenden.

Zur Synthese setzten wir 5'-O-Acetyl-uridin und Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid²⁾ in wasserfreiem Pyridin um, hydrolysierten anschließend mit Wasser, spalteten die Acetylgruppe mit Ammoniak ab und trennten die Reaktionsprodukte auf einer DEAE-Cellulosesäule. Wir erhielten das gewünschte Produkt **3** (12%) und daneben Uridin-2'.3'-cyclophosphat (**4**) (9%).

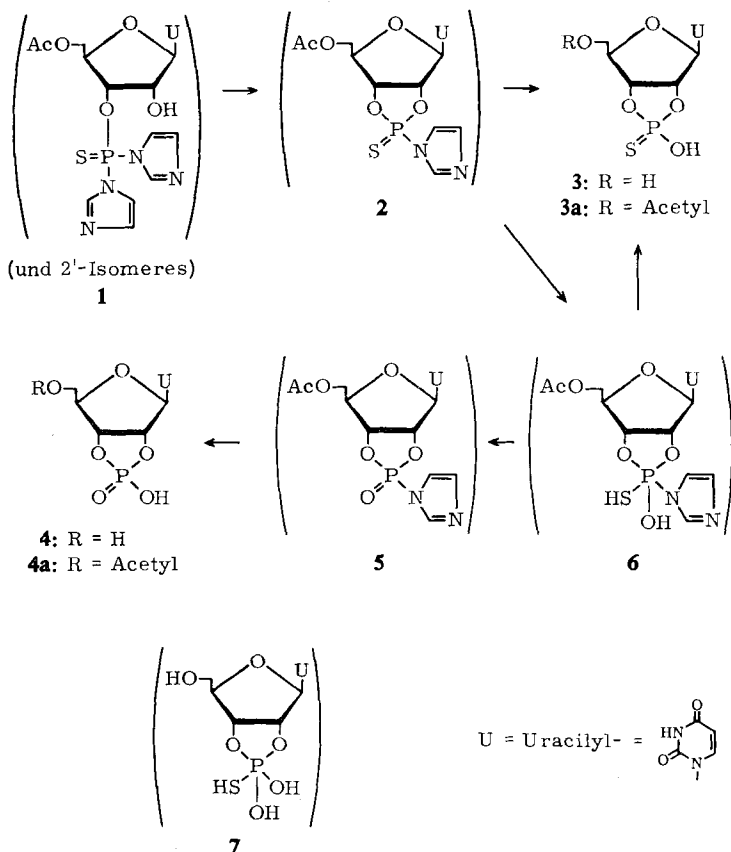
3 wird unter den Bedingungen der Synthese und Aufarbeitung zu nicht mehr als 5% in **4** umgewandelt. Der sehr viel höhere Anteil an **4** bei der Synthese von **3** muß deshalb durch einen Austausch von Schwefel gegen Sauerstoff, der zeitlich vor der Bildung von **3** erfolgen muß, erklärt werden. Bei der Reaktion von 5'-O-Acetyl-uridin mit Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid hat man sicher **1** als erstes Reaktionsprodukt anzunehmen. Abgesehen davon, daß in der Reaktionslösung kein Wasser (das zum Austausch notwendig ist) vorhanden ist, wissen wir, daß solche Verbindungen, jedenfalls im Fall des Uridin-5'-[thiophosphorsäure-diimidazolids], selbst bei Anwesenheit von Wasser sicher nicht mehr als 5% Schwefel verlieren³⁾.

1 cyclisiert zu **2**, das durch Hydrolyse in **3a** aber auch in **4a** übergehen kann. Die Hydrolyse zu **3a** läßt sich durch eine S_N2-Reaktion erklären, während die Bildung von **4a** durch die Ausbildung eines pentakovalenten Phosphors in **6** durch Addition von Wasser an **2** erklärt werden könnte. **6** kann durch Eliminierung von HS[⊖] in **5** übergehen, das wiederum leicht zu **4a** hydrolysieren kann. **6** kann durch Eliminierung von Imidazol auch in **3a** übergehen. Nach welchem von beiden Mechanismen die Bildung von **3a** verläuft, läßt sich auf Grund unserer Ergebnisse nicht entscheiden.

¹⁾ E. A. Dennis und F. H. Westheimer, J. Amer. chem. Soc. **88**, 3432 (1966) und dort angeführte Zitate.

²⁾ F. Eckstein, J. Amer. chem. Soc. **88**, 4292 (1966).

³⁾ F. Eckstein und H. Gindl, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **149**, 35 (1967).



Leider haben wir **2** bisher nicht isolieren können, so daß die Erklärung zur Bildung von **4** nicht als bewiesen angesehen werden kann*).

Unter Verwendung von $^{35}\text{SPCl}_3$ als Ausgangsmaterial für das Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid haben wir nach der gleichen Methode [^{35}S]Uridin-2'.3'-O.O-cyclothiophosphat dargestellt. Die alkalische Hydrolyse dieser Verbindung in 0.2 n KOH lieferte nach 1 Stde. bei Raumtemperatur 75% Uridin-2'(3)-O-thiophosphat und 25% nicht umgesetztes Ausgangsmaterial. Beide Substanzen wurden papierchromatographisch getrennt und der Gehalt an ^{35}S der UV-aktiven Flecken im Scintillationszähler bestimmt. Keine der beiden Verbindungen hatte Schwefel verloren. Am einfachsten läßt sich dieser Befund durch eine $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion erklären.

* *Anm. b. d. Korr.* (6. 3. 68): Verfolgt man die beschriebene Reaktion durch Messung der ^{31}P -kernmagnetischen Resonanz, so sieht man neben dem Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid ($\delta = -64$ ppm) erst nur ein neues Signal ($\delta = -180$ ppm), das wir **2** zuordnen. Durch Zugabe von Wasser verschwindet dieses Signal, während 2 neu auftretende **3** ($\delta = -162$ ppm, d) und **4** ($\delta = -38$ ppm) zugeordnet werden können.

Die Messungen wurden an einem Perkin Elmer R 10 Spectrometer in Verbindung mit einem Northern Scientific NS 544 Digital Memory Oscilloscope in Pyridin mit 30proz. Phosphorsäure als Standard durchgeführt.

Saure Hydrolyse von **3** in 0.5 *n* HClO₄ bei Raumtemperatur für 1 Stde. lieferte 69% nicht umgesetztes **3** mit vollem Schwefelgehalt. Das gebildete Uridinmonophosphat (31%) bestand zu 72% aus Uridin-2'(3')-phosphat und zu 28% aus Uridin-2'(3')-thiophosphat, wie sich aus der Verteilung des ³⁵S ergibt. Da Uridin-2'(3')-thiophosphat unter den Hydrolysebedingungen keinen Schwefel verliert, muß man folgern, daß bei **3** Schwefel zum Teil gegen Sauerstoff ausgetauscht worden ist. Der einfachste Mechanismus für einen solchen Austausch besteht wieder in der Ausbildung eines pentakovalenten Phosphors durch Addition von Wasser an **3** zu **7**. Durch Eliminierung von HS[⊖] würde **7** in **4** übergehen, welches unter den Reaktionsbedingungen sofort zu Uridin-2'(3')-phosphat hydrolysiert. Trennung der P—O—C-Bindung in **7** würde Uridin-2'(3')-thiophosphat entstehen lassen.

Die Beobachtungen des Schwefelaustausches bei der sauren Hydrolyse von **3** decken sich mit den Ergebnissen des Sauerstoffaustausches bei der Hydrolyse von Äthylencyclophosphat⁴⁾. Allerdings ist bei **3** die Austauschreaktion schneller als die Hydrolyse, während die Verhältnisse bei Äthylencyclophosphat umgekehrt sind.

Ersetzt man in der beschriebenen Synthese Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid durch Tri-imidazolyl-(1)-phosphinoxid⁵⁾, so erhält man **4** in 55proz. Ausbeute. Diese Methode bietet daher auch eine äußerst schonende Synthesemöglichkeit für Cyclophosphate.

Über die Versuche zur Spaltung von **3** mit Pankreasribonuclease wird an anderer Stelle berichtet werden.

Die Autoren danken Herrn Prof. *F. Cramer* für großzügige Unterstützung und anregende Diskussionen sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für eine Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

Alle Papierchromatogramme (Papier Schleicher & Schüll, 2043 b, gewaschen) wurden absteigend entwickelt [Laufmittel Äthanol/1 *m* Ammoniumacetat (7 : 3, v/v)]. Elektrophoresen wurden auf dem gleichen Papier in Puffer pH 7.5 (0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat) ausgeführt. Säulenchromatographien an DEAE-Cellulose wurden mit einem linearen Gradienten am Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3/ 0.125 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß, 3/ Wasser im Mischgefäß) ausgeführt. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (Tricarb Model 4312) gemessen.

Uridin-2'.3'-O.O-cyclothiophosphat (3): 3.8 g *5'-O-Acetyl-uridin* (13 mMol) wurden zu 7.0 g *Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid* (26 mMol) in 300 ccm Pyridin gegeben. Am anderen Morgen wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 100 ccm Wasser, das mit Ammoniak auf pH 8.5 gebracht worden war, versetzt. Nach 2 Stdn. wurde zur Trockne eingedampft und durch 2stdg. Behandlung mit 100 ccm konz. *Ammoniak* die Acetylgruppe abgespalten. Chromatographie an einer DEAE-Cellulosesäule lieferte 2 Produkte, die durch präparative Dünnschichtchromatographie [Kieselgel Merck PF₂₅₄, Äthanol/0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat (5 : 2, v/v)] von anorganischem Phosphat getrennt wurden⁶⁾. Produkt A [Ausb. 11 700 OD-Einheiten (260 mμ), (9%)] war elektrophoretisch und

⁴⁾ *P. C. Haake* und *F. H. Westheimer*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1102 (1961).

⁵⁾ *F. Cramer*, *H. Schaller* und *H. A. Staab*, *Chem. Ber.* **94**, 1612 (1961).

⁶⁾ Nach *K. H. Scheit*, Göttingen, unveröffentlicht.

papierchromatographisch (R_F 0.57) identisch mit *Uridin-2',3'-cyclophosphat* (4). Produkt B (3) [Ausb. 15 500 OD-Einheiten (260 m μ), (12%)] war elektrophoretisch ebenfalls identisch mit 4, papierchromatographisch jedoch verschieden (R_F 0.65).

$C_9H_{11}N_2O_7PS \cdot H_2O$ (340.2) Ber. C 31.87 H 3.86 N 8.25 P 9.13 S 9.45
Gef. C 31.68 H 3.60 N 8.92 P 7.73 S 7.93

Uridin-2',3'-cyclophosphat (4): Wie für 3 beschrieben, jedoch wurde Tri-imidazolyl-(1)-phosphinsulfid durch *Tri-imidazolyl-(1)-phosphinoxid* ersetzt. Ausb. 70 000 OD-Einheiten (260 m μ) (54%). Das Produkt war elektrophoretisch und papierchromatographisch identisch mit authent. Material.

Hydrolyse von 3

a) *Sauer*: 150 μ l einer wäßr. Lösung, enthaltend 3 μ Mol [^{35}S] *Uridin-2',3'-cyclothiophosphat* (spezif. Aktivität 0.075 μ C/ μ Mol) wurden zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 0.1 ccm 0.5n *HClO*₄ gelöst. Nach 1 Stde. neutralisierte man mit 0.1 ccm 0.5n *KOH* und trennte zweimal je 50 μ l der neutralen Lösung papierchromatographisch. Die UV-aktiven Flecken wurden ausgeschnitten. Je eine Probe wurde zur Bestimmung der optischen Dichte mit *CH*₃*OH/H*₂*O* (1:1, v/v) eluiert, und je eine zur Messung der Radioaktivität benutzt.

b) *Alkalisches*: Wie unter a), jedoch wurde in 0.1 ccm 0.2n *KOH* gelöst und mit 0.1 ccm 0.2n *HClO*₄ neutralisiert.

Verteilung der Radioaktivität auf die Hydrolyseprodukte

Produkt	Alkalische Hydrolyse			Saure Hydrolyse		
	Wieder- gewonnene OD-Einh.	Gef. cpm	Ber.	Wieder- gewonnene OD-Einh.	Gef. cpm	Ber.
Uridin-2'(3')- thiophosphat	3.20	18 309	17 500	2.25	3 706	12 200
Uridin-2',3'- cyclothiophosphat	1.10	6 000	5 992	5.00	27 509	27 200

[530/67]