

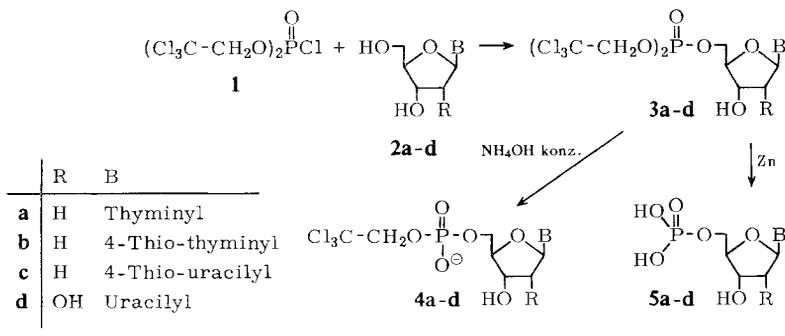
Albrecht Franke, Karl-Heinz Scheit<sup>1)</sup> und Fritz Eckstein

## Selektive Phosphorylierung von Nucleosiden

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen  
(Eingegangen am 22. März 1968)

Phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester]-chlorid eignet sich zur selektiven Phosphorylierung von Nucleosiden in 5'-Stellung. Die entstehenden Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthyl]-phosphate lassen sich in Ausbeuten von 40–70% isolieren. Die Triester werden durch Behandeln mit Zinkstaub in Nucleosid-5'-phosphate übergeführt.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß sich Phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester]-chlorid (**1**) hervorragend zur Phosphorylierung von geschützten Nucleosiden eignet<sup>2)</sup>. Die dabei entstehenden Nucleosid-phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] lassen sich leicht und in guter Ausbeute, meist in kristalliner Form, isolieren. Diese Triester werden durch Behandlung mit Cu/Zn in Dimethylformamid oder Zn-Staub in 80proz. Essigsäure zu Nucleosidphosphaten gespalten<sup>3)</sup>. Es war anzunehmen, daß **1** auf Grund der beiden raumbeanspruchenden Trichloräthylgruppen eine gewisse Selektivität bei der Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside besitzen sollte. Bei der Reaktion von äquiv. Mengen **1** mit Desoxythymidin beobachteten wir tatsächlich nur ein Reaktionsprodukt. Die Analyse der kristallinen Verbindung ergab, daß es sich um Desoxythymidin-phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] handelte. Den Nachweis dafür, ob Substitution in 5'- oder 3'-Stellung erfolgte, führten wir auf folgende Weise. Der Triester wurde durch Behandeln mit konz. wäßrigem Ammoniak unter Abspaltung einer Trichloräthylgruppe in Desoxythymidin-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] übergeführt. Da dieser Diester von



<sup>1)</sup> Anfragen können an diesen Autor gerichtet werden.

<sup>2)</sup> F. Eckstein und K.-H. Scheit, *Angew. Chem.* **79**, 317 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* **6**, 362 (1967).

<sup>3)</sup> F. Eckstein, *Chem. Ber.* **100**, 2228 (1967).

Schlängengift-Phosphodiesterase quantitativ zu Desoxythymidin-5'-phosphat gespalten wurde, muß die Phosphorylierung von Desoxythymidin durch **1** ausschließlich in 5'-Stellung erfolgt sein.

Kurzes Kochen von **3a** in wäßrigem Pyridin mit Zn-Staub führte zu Desoxythymidin-5'-phosphat (**5a**), welches papierchromatographisch mit authentischer Substanz identisch war. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei der Phosphorylierung von Desoxy-4-thio-thymidin (**2b**), Desoxy-4-thio-uridin (**2c**) und Uridin (**2d**). Die entsprechenden Triester wurden in Ausbeuten von 75–42% durch Umkristallisation des Rohproduktes erhalten. Der Triester **3d** wurde in amorpher Form durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel isoliert. Bei der Anwendung eines Überschusses an Phosphorylierungsreagens **1** beobachteten wir die Bildung von Disubstitutionsprodukten.

Die Vorteile dieser Phosphorylierungsmethode scheinen uns diese zu sein:

- 1) Zur Darstellung von Nucleosid-5'-phosphaten ist es nicht mehr erforderlich, geschützte Nucleoside mit freier 5'-OH-Gruppe zu bereiten. (Vgl. auch l. c.<sup>4,5</sup>)
- 2) Die Stabilität der Triester erlaubt es, die Phosphorylierungsprodukte leicht und in großer Reinheit abzutrennen.
- 3) Die Abspaltung der Trichloräthylgruppen durch Zinkstaub in Pyridin erfolgt unter milden Bedingungen zu 90–95%. Die gebildeten Nucleotide können durch präparative Dünnschichtchromatographie in großer Reinheit, frei von Phosphorsäure, isoliert werden.
- 4) Diese Methode kann auch zur Phosphorylierung großer Mengen Nucleoside benutzt werden.

## Beschreibung der Versuche

*Allgemeine Bemerkungen:* Pyridin wurde über Calciumhydrid getrocknet und destilliert. UV-Spektren wurden mit den Geräten PMQ II und Cary 14 gemessen. Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Reichert, Österreich) bestimmt und sind nicht korrigiert.

*Papierchromatographie:* Papier Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen); Lösungsmittel Äthanol/*m* CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> = 5 : 2 (A) bzw. 2*n* HCl/*n*-Propanol = 1 : 3 (B).

*Dünnschichtchromatographie:* Für analytische Zwecke wurden Silicagel-Dünnschichtplatten F<sub>254</sub> (Merck AG), für präparative Trennungen Silicagel PF<sub>254</sub> (Merck AG) verwendet. Lösungsmittel Chloroform/Methanol = 95 : 5 (C) bzw. Chloroform/Methanol = 7 : 3 (D) bzw. Propanol-(2)/NH<sub>4</sub>OH<sub>konz.</sub>/H<sub>2</sub>O = 7 : 1 : 2 (E).

*Darstellung der Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthyl]-phosphate:* 1 mMol Nucleosid wurde durch mehrmaliges Abdestillieren von Pyridin getrocknet, zum Rückstand wurde in 5 ccm Pyridin 1.2 mMol Phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester]-chlorid (**1**) unter Kühlung gegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 Std. bei 3° aufbewahrt und anschließend zur Trockne eingengt. Den Rückstand löste man in 50 ccm Chloroform und extrahierte mit 4 mal 25 ccm Wasser. Die Chloroformphase wurde eingengt, der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert oder das amorphe Produkt durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in Lösungsmittel C isoliert.

<sup>4)</sup> M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Letters [London] 1967, 5065.

<sup>5)</sup> M. Honjo, T. Masuda, K. Imai und S. J. Fujii, VII. Biochemischer Kongreß, Tokyo 1967, Abstract IV, 620.

Tab. 1. Darstellung von Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-}\alpha\text{-ethyl-}]\text{-phosphaten}$ 

Synthese- produkt	Ansatz	Ausb.	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen	UV-Spektrum (in Methanol)
					C H N P S	
<b>3a</b>	1.0 mMol <b>2a</b> (250 mg)	450 mg $\cong 75\%$	139°	$C_{14}H_{17}Cl_6N_2O_8P$ (585.0)	Ber. 28.87 2.92 4.81 5.33 —	$\lambda_{\max}$ 265 m $\mu$ , $\epsilon$ 9100;
	1.2 mMol <b>1</b> (450 mg)				Gef. 28.99 3.73 4.85 5.11 —	$\lambda_{\min}$ 232 m $\mu$ , $\epsilon$ 2600
<b>3b</b>	1 mMol <b>2b</b> (450 mg)	370 mg $\cong 60.5\%$	158—159°	$C_{14}H_{17}Cl_6N_2O_7PS$ (601.1)	Ber. 28.09 2.84 4.68 5.18 5.35	$\lambda_{\max}$ 323 m $\mu$ , $\epsilon$ 20500;
	1.2 mMol <b>1</b> (450 mg)				Gef. 28.06 3.02 4.71 5.20 5.45	$\lambda_{\max}$ 236 m $\mu$ , $\epsilon$ 5000; $\lambda_{\min}$ 273 m $\mu$ , $\epsilon$ 2080; $\lambda_{\min}$ 222 m $\mu$ , $\epsilon$ 4040
<b>3c</b>	1.5 mMol <b>2c</b> (360 mg)	370 mg $\cong 42\%$	150—151°	$C_{13}H_{15}Cl_6N_2O_7PS$ (587.0)	Ber. 26.71 2.57 4.79 5.31 5.48	$\lambda_{\max}$ 330 m $\mu$ , $\epsilon$ 18400;
	1.8 mMol <b>1</b> (685 mg)				Gef. 26.92 2.56 4.70 5.17 5.32	$\lambda_{\max}$ 249 m $\mu$ , $\epsilon$ 5950; $\lambda_{\min}$ 280 m $\mu$ , $\epsilon$ 2500; $\lambda_{\min}$ 225 m $\mu$ , $\epsilon$ 3150
<b>3d</b>	1 mMol <b>2d</b> (244 mg)	1.10 g $\cong 45.5\%$	amorph	$C_{13}H_{15}Cl_6N_2O_9P$ (587.0)	Ber. 26.80 2.57 4.80 5.32 —	$\lambda_{\max}$ 260 m $\mu$ , $\epsilon$ 9900;
	1.2 mMol <b>1</b> (450 mg)				Gef. 26.87 2.77 4.64 5.15 —	$\lambda_{\min}$ 229 m $\mu$ , $\epsilon$ 3100

Tab. 2.  $R_F$ -Werte

Substanz	Lösungsmittel-System				E
	A	B	C	D	
<b>2a</b>			0.14		
<b>2b</b>			0.22		
<b>2c</b>			0.09		
<b>2d</b>			0		
<b>4a</b>	0.75			0.15	0.76
<b>4b</b>	0.87			0.27	0.66
<b>4c</b>	0.79			0.22	
<b>4d</b>	0.76			0.05	0.53
<b>3a</b>			0.35		
<b>3b</b>			0.51		
<b>3c</b>			0.23		
<b>3d</b>			0.10		
<b>5a</b>	0.26	0.78			0.23
Desoxythymidin- 3'-phosphat		0.86			
<b>5b</b>	0.35	0.77			0.24
Desoxy-4-thio- thymidin-3'-phosphat		0.86			
<b>5c</b>	0.26				
<b>5d</b>	0.14	0.55			0.11
Uridin-3'-phosphat		0.66			

*Spaltung der Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$  zu den Nucleosid-5'- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphaten}$ :* 0.1 mMol *Triester* wurde in 5 ccm *Pyridin*/ $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{Konz.}}$  (1:1) gelöst. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wurde eingengt und der *Diester* durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel D isoliert.

*Spaltung der Nucleosid-5'-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$  zu Nucleosid-5'-phosphaten:* 0.1 mMol *Triester* wurde in 3 ccm *Pyridin*/Wasser (9:1) mit 50–100 mg *Zinkstaub* 5 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach Abzentrifugieren des *Zinkstaubes* wurden die  $\text{Zn}^{++}$ -Kationen durch Filtrieren der Lösung über Ionenaustauscher ( $\text{H}^+$ , Merck) entfernt. Das Filtrat wurde eingengt und das *Nucleotid* durch präparative Dünnschichtchromatographie an *Silicagel* in *Propanol*-(2)/0.5 *m Triäthylammoniumhydrogencarbonat* (9:2) isoliert.

*Enzymatische Hydrolyse der Nucleosid-5'- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthyl}]\text{-phosphate}$  durch Schlangengift-Phosphodiesterase:* 1  $\mu\text{Mol}$  *Diester* wurde in 0.2 ccm 0.1 *m Tris-Puffer* pH 8 mit 10  $\mu\text{g}$  *Enzym* (E. C. 3.1.4.1, Fa. Böhlinger, Mannheim) 10 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Hydrolysat wurde papierchromatographisch im Lösungsmittel A getrennt.

[119/68]