

Richard R. Schmidt und Hans-Joachim Fritz

Synthese und Struktur von Inosin-5'-carbonsäure und Derivaten

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart

(Eingegangen am 26. Januar 1970)



Die Oxydation von 2',3'-*O*-Isopropyliden-inosin (**1**) mit Chrom(VI)-oxid in Eisessig führt in guten Ausbeuten und selektiv zur 2',3'-*O*-Isopropyliden-inosin-5'-carbonsäure (**2**). Aus **2** wird die ungeschützte Inosin-5'-carbonsäure (**4**) hergestellt, ferner wird die Synthese von Estern von **2** und **4** beschrieben. Die Konformation der hergestellten Inosin-Derivate wird diskutiert.

Synthesis and Structure of Inosine-5'-carboxylic Acid and Derivatives

The oxidation of 2',3'-*O*-isopropylidene-inosine (**1**) with chromium(VI)-oxide in acetic acid leads in good yields and selectively to 2',3'-*O*-isopropylidene-inosine-5'-carboxylic acid (**2**). **2** is transformed into the unprotected inosine-5'-carboxylic acid and into esters of **2** and **4**. The conformation of the synthesized inosine derivatives is discussed.



Unsere Versuche zur Synthese von Nucleosid-5'-carbonsäuren dienen der Herstellung geeignet modifizierter Nucleoside und Nucleotide, die zur Lösung biochemischer Probleme herangezogen werden sollen¹⁾. Das einzige präparativ interessante Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-5'-carbonsäuren besteht in der direkten, katalytischen Oxydation von Nucleosiden nach *Todd* und Mitarbb.²⁾ Die mit diesem Verfahren verbundenen Schwierigkeiten führten uns dazu, nichtkatalytische Verfahren der direkten Oxydation von Nucleosiden oder in 2',3'-*O*-Stellung geschützter Nucleoside aufzusuchen. Ein solches fanden wir in der Oxydation von 2',3'-*O*-Isopropyliden-adenosin in wäßrig-alkalischer Lösung mit KMnO_4 , das nun in 90proz. Ausbeute zu Adenosin-5'-carbonsäure führt^{1,3)}.

Inosin-5'-carbonsäure (**4**)

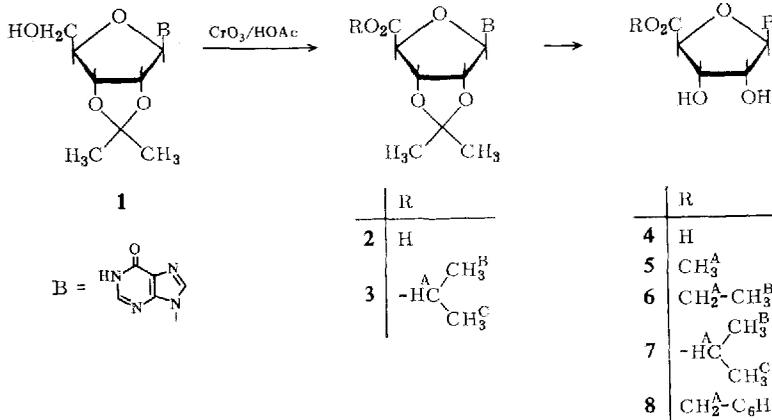
Das Verfahren zur Oxydation von 2',3'-*O*-Isopropyliden-adenosin ist bei den anderen natürlichen 2',3'-*O*-Isopropyliden-nucleosiden weniger erfolgreich oder es versagt fast ganz. Es mußte also ein Verfahren gefunden werden, das die Selektivität der Oxydation der primären Hydroxymethylgruppe erhöht. Diesen Effekt versprachen wir uns von einer Oxydation in einem wasserfreien, sauren Medium: Zum einen sollte durch Protonierung oder Wasserstoffbrückenbindungen die Elektronendichte der Nucleobase verringert und damit die Oxydierbarkeit herabgesetzt werden, zum anderen sollte die 2',3'-*O*-Isopropyliden-Schutzgruppe und die glykosidische Bindung in einem wasserfreien, aciden Medium nicht angegriffen werden.

¹⁾ R. R. Schmidt, U. Schloz und D. Schwille, Chem. Ber. **101**, 590 (1968).

²⁾ G. P. Moss, C. B. Reese, K. Schofield und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1963**, 1149.

³⁾ U. Schloz, Dissertat., Univ. Stuttgart, in Vorbereitung.

Als derartiges Oxydationsmittel bot sich *Fiesers* Reagens⁴⁾ an (Suspension von CrO_3 in absol. Essigsäure). **1** konnte damit in guter Ausbeute zu 2'-3'-*O*-Isopropyliden-5'-carbonsäure (**2**) oxydiert werden. Bei geeignetem Ansatz fiel **2** während der Reaktion aus und war damit dem weiteren Angriff des Oxydationsmittels entzogen. Die Reaktion verbrauchte mehr als die stöchiometrische Menge CrO_3 . Die optimale Ausbeute wurde jedoch mit stöchiometrischen Mengen CrO_3 erhalten.



2 ließ sich mit 1 *n* HCl bei 60° in 15 Min. in guter Ausbeute in Inosin-5'-carbonsäure (**4**) umwandeln, die aus Eisessig umkristallisiert werden kann. Die Substanz hält jedoch Eisessig und Wasser so hartnäckig fest, daß es bisher nicht gelang, eine analysenreine Probe zu erhalten. Das Produkt ist chromatographisch frei von anderen Inosinderivaten und NMR-spektroskopisch sowie durch weitere Umsetzungen eindeutig als **4** identifiziert. **4** hat ein Löslichkeitsminimum in Wasser bei pH 2.5, Adenosin-5'-carbonsäure³⁾ bei pH 4.6. Die UV-Spektren von Adenosin, Adenosin-5'-carbonsäure und deren Na-Salz ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 259 \text{ m}\mu$) und ebenso die UV-Spektren von **1**, **2**, **4** und dem Na-Salz von **4** ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 249 \text{ m}\mu$) stimmen im Bereich von 220–330 $\text{m}\mu$ überein. Da protoniertes Adenosin ($\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 2} = 257 \text{ m}\mu$) und Inosin ($\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 1} = 247 \text{ m}\mu$) kürzerwellig absorbieren, liegen die hergestellten Nucleosid-5'-carbonsäuren vermutlich nicht in der Betainform vor.

Inosin-5'-carbonsäureester (**3**, **5–8**)

Die üblichen Veresterungsverfahren – auch die für Uronsäuren allgemein angewandten⁵⁾ – sind für Nucleosid-5'-carbonsäuren wenig erfolgreich, da die glykosidische Bindung geschont werden muß und die Nucleobase während der Veresterung nicht alkyliert werden darf. Als geeignetes Verfahren für die Veresterung erwies sich die Suspension von **2** in absol. Alkohol und anschließende bis zu einigen Tagen dauernde Behandlung mit Thionylchlorid³⁾. Thionylchlorid katalysiert die Ketalisierung und in einem protischen Medium die Entketalisierung. Es ist deshalb nicht überraschend, daß aus **2** und Methanol bzw. Äthanol und Benzylalkohol direkt **5**, **6** und **8** in guten Ausbeuten gebildet wurden.

⁴⁾ L. F. Fieser, J. Amer. chem. Soc. **70**, 3237 (1948).

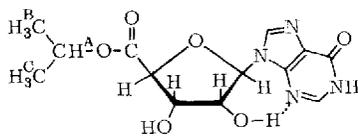
⁵⁾ E. Hardegger und D. Spitz, Helv. chim. Acta **33**, 337 (1950).

Mit absol. Isopropylalkohol erfolgte keine Abspaltung der Schutzgruppe, sondern es entstand **3**. Der ungeschützte Inosin-5'-carbonsäure-isopropylester (**7**) und ebenso **5** wurden deshalb nach dem gleichen Verfahren aus **4** hergestellt. Diese Reaktionen dienten gleichzeitig der weiteren Identifizierung von **4**.

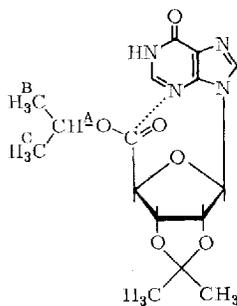
Konformation der Inosin-5'-carbonsäuren und Derivate

Die heterocyclische Base und der Zucker können bei Nucleosiden und Nucleotiden zwei bevorzugte Konformere bilden: die *syn*- und die *anti*-Form⁶⁾. Röntgenstrukturanalysen⁷⁻¹⁰⁾ zeigten, daß die meisten Nucleoside und Nucleotide im festen Zustand die *anti*-Konformation bevorzugen. Nach NMR-^{11,12)}, ORD-^{13,14)} und CD-¹⁴⁾ Untersuchungen sind die Verhältnisse in Lösung wesentlich unübersichtlicher und nur in Ausnahmefällen eindeutig. Sowohl theoretische Ansätze^{15,16)} als auch experimentelle Befunde lassen jedoch darauf schließen, daß eine beträchtliche Rotationsbarriere um die glykosidische C-N-Bindung besteht.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Inosin-5'-carbonsäure und ihrer Derivate führte zu den in der Tab. aufgeführten Resonanzsignalen. Danach unterscheiden sich die in 2'.3'-Stellung durch die Isopropylidengruppe geschützten Verbindungen **2** und **3** charakteristisch von den ungeschützten **4-8** und vom Inosin und 2'.3'-*O*-Isopropyliden-inosin (**1**). Die Ursache dieser Differenz ist im Vorliegen von stabilen *syn*- und *anti*-Konformeren zu suchen. Die Zuordnung zur *syn*- oder *anti*-



7 (*anti*-Konformation)



3 (*syn*-Konformation)

- 6) J. Donohue und K. N. Trueblood, J. molecular Biol. **2**, 363 (1960).
- 7) J. Kraut, Annu. Rev. Biochem. **34**, 247 (1965).
- 8) V. Sazisekharan, A. V. Lakshminarayanan und G. N. Ramachandran, in „Conformation of Biopolymers“ (G. N. Ramachandran, ed.) Vol. **2**, S. 641, Academic Press, New York 1967.
- 9) A. E. V. Haschemeyer und A. Rich, J. molecular Biol. **27**, 369 (1967).
- 10) J. Kraut und L. H. Jensen, Acta crystallogr. [Copenhagen] **16**, 79 (1963).
- 11) M. P. Schweizer, A. D. Broom, P. O. P. Ts'o und D. P. Hollis, J. Amer. chem. Soc. **90**, 1042 (1968).
- 12) R. J. Cushley, K. A. Watanabe und J. J. Fox, J. Amer. chem. Soc. **89**, 394 (1967); Chem. Commun. **1966**, 598.
- 13) T. L. V. Ulbricht, Vortrag auf dem Symposium für Nucleinsäurechemie, Liblice/Tschoschlowakei, September 1969.
- 14) J. T. Young und T. Samejima, Progr. Nucleic Acid Research Molecular Biology **9**, 223 (1969).
- 15) J. Tinoco jr., R. C. Davis und S. R. Jaskunas in „Molecular Associations in Biology“ (B. Pullman ed.) S. 77, Academic Press, New York 1968.
- 16) F. Jordan und B. Pullman, Theoret. chim. Acta **9**, 242 (1968).

Konformation wird durch den Vergleich der Isopropylester **3** und **7** möglich. Die Stabilisierung der *anti*-Konformation bei **7** durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und N-3 ist bei **3** nicht möglich. Das führt dann zur Stabilisierung der *syn*-Konformation durch die Elektronendonator-Acceptor-Wechselwirkung zwischen N-3 und der Alkoxy-carbonylgruppe. Dadurch sollte jedoch die freie Drehbarkeit der Isopropylgruppe um die C—O-Bindung bei **3** stark gehindert sein. Erwartungsgemäß sind die beiden Methylsignale der Isopropylgruppe bei **7** identisch ($\tau = 8.75$) und bei **3** nicht identisch ($\tau = 8.88$ und 9.11 ppm). Versuche, durch Temperaturerhöhung die Einschränkung der freien Drehbarkeit der Isopropylgruppe und die Fixierung der *syn*-Konformation bei **3** aufzuheben, führten bis 117° lediglich zu einer Annäherung der Methylsignale; dies spricht für eine sehr starke Fixierung der Konformation. Oberhalb dieser Temperatur reagierte das Lösungsmittel DMSO- d_6 mit **3**.

Resonanzsignale von Inosin, **1–8** in DMSO- d_6 mit TMS als innerem Standard (τ -Werte in ppm)

Verbindung	Temp. °C	8-H	2-H	1'-H	HA	HB	HC
1	25	1.68	1.84	3.83 (d)	—	—	—
2	25	1.75	1.95	3.63 (d)	—	—	—
3	25	1.74	1.95	3.58 (d)	5.33 (sep)	8.88 (d)	9.11 (d)
	74	1.82	2.02	3.63 (d)	5.30 (sep)	8.87 (d)	9.04 (d)
3	117	1.91	2.10	3.66 (d)	5.31 (sep)	8.87 (d)	9.00 (d)
	117	1.91	2.10	3.66 (d)	5.31 (sep)	8.87 (d)	9.00 (d)
4	25	1.55	1.85	3.92 (d)	—	—	—
5	25	1.62	1.86	3.92 (d)	6.22 (s)	—	—
6	25	1.60	1.84	3.93 (d)	5.77 (q)	8.75 (t)	—
7	25	1.60	1.82	3.90 (d)	4.94 (sep)	8.75 (d)	8.75 (d)
8	25	1.60	1.84	3.89 (d)	4.72 (s)	—	—
Inosin	25	1.60	1.85	4.02 (d)	—	—	—

Wir danken Herrn Professor Dr. H. Bredereck für die Förderung dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung unserer Untersuchungen und der Zellstoffabrik Waldhof (Mannheim) für die Überlassung von Ausgangsmaterialien.

Beschreibung der Versuche

2',3'-O-Isopropyliden-inosin-5'-carbonsäure (**2**): 18 g (0.058 Mol) 2',3'-O-Isopropyliden-inosin (**1**) wurden in 400 ccm Eisessig bei 15° mit 8.0 g (0.08 Mol) Chrom(VI)-oxid versetzt. Die anfänglich braune Suspension verfärbte sich nach einigen Stdn. nach Grün. Nach 2 Tagen konnten 10.3 g **2** (55%, bez. auf eingesetztes **1**) abfiltriert werden, Schmp. 252° . Die Mutterlauge enthielt noch **1** sowie kleinere Mengen **2** (DC: Kieselgel, Laufmittel Isopropylalkohol/ $\text{NH}_3 = 10:1$). Sie wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand bei Raumtemperatur mit 100 ccm Wasser behandelt. Nach 3 Stdn. wurden 5.0 g **1** + **2** von der Chrom(III)-acetat-Lösung abfiltriert. Dieses Gemisch wurde bei weiteren Oxydationen von **1** mit eingesetzt.

2 konnte aus Eisessig umkristallisiert werden. Zur Entfernung des Lösungsmittels mußte mehrere Tage i. Hochvak. bei 60° getrocknet werden.

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6$ (322.3) Ber. C 48.45 H 4.38 N 17.39 Gef. C 48.65 H 4.46 N 17.69

2'.3'-O-Isopropyliden-inosin-5'-carbonsäure-isopropylester (**3**): 0.48 g (1.5 mMol) **2** wurden in 30 ccm absol. Isopropylalkohol suspendiert und mit 0.35 ccm Thionylchlorid versetzt. Nach 2 Tagen wurde die klare Lösung in eine Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingerührt und 0.40 g (75%) **3** abfiltriert, Schmp. 221°.

$C_{16}H_{20}N_4O_6$ (364.3) Ber. C 52.74 H 5.53 N 15.38 Gef. C 52.54 H 5.45 N 15.13

Inosin-5'-carbonsäure (**4**): 0.32 g (1.0 mMol) **2** wurden mit 15 ccm 1 n HCl bei 60° hydrolysiert. Anschließend wurde auf 0° abgekühlt und mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 2.5 eingestellt. **4** fiel als farblose Kristallmasse aus. Ausb. 0.22 g (78%), Schmp. 320°; DC: Kiesegel, Laufmittel Äthanol/Isopropylalkohol 85:15, R_F 0.37. Das Produkt war für weitere Umsetzungen genügend rein, jedoch nicht ganz analysenrein. Umkristallisation war aus Eisessig möglich, das Lösungsmittel konnte jedoch nicht quantitativ entfernt werden.

Inosin-5'-carbonsäure-methylester (**5**): Zur Suspension von 0.564 g (2 mMol) **4** in 14 ccm Methanol wurden bei 0° 0.29 ccm Thionylchlorid gegeben. Aus der nun klaren Lösung fiel nach 10–15 Min. eine farblose Substanz. Nach 6 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch zur Neutralisation in Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingerührt. **5** fiel analysenrein aus. Ausb. 0.421 g (71%), Schmp. 222°.

5 konnte analog aus **2** in 60proz. Ausb. hergestellt werden.

$C_{11}H_{12}N_4O_6$ (296.2) Ber. C 44.60 H 4.08 N 18.91 Gef. C 44.18 H 4.11 N 18.53

Inosin-5'-carbonsäure-äthylester (**6**): 0.322 g (1 mMol) **2** wurden, in 5 ccm absol. Äthanol suspendiert, bei 0° mit 0.15 ccm Thionylchlorid versetzt. Nach 12 Stdn. erfolgte die Aufarbeitung wie bei **5**. Umkristallisation aus Äthanol lieferte 0.14 g (45%) **6**, Schmp. 227–229°.

$C_{12}H_{14}N_4O_6$ (310.3) Ber. C 46.45 H 4.55 N 18.06 Gef. C 46.26 H 4.65 N 18.13

Inosin-5'-carbonsäure-isopropylester (**7**): 0.75 g (2.65 mMol) **4** wurden in 40 ccm absol. Isopropylalkohol bei 0° mit 0.7 ccm Thionylchlorid versetzt. Nach 12 Stdn. erfolgte die Aufarbeitung wie bei **5**. Es fielen 0.39 g **7** (45%) analysenrein aus.

$C_{13}H_{16}N_4O_6$ (324.3) Ber. C 48.15 H 4.97 N 17.28 Gef. C 47.99 H 4.89 N 17.06

Inosin-5'-carbonsäure-benzylester (**8**): Die Herstellung erfolgte wie für **7** angegeben. Ausb. 38%. Schmp. 194–195°.

$C_{17}H_{16}N_4O_6$ (372.3) Ber. N 15.05 Gef. N 14.94

[31/70]