

Peter Faerber und Karl Heinz Scheit

Synthese von 5'-Mono-, 5'-Di- und 5'-Triphosphaten der Nucleoside 2.4-Dithio-uridin, 2.4-Dithio-ribothymidin, 2-Thio-thymidin und 2.4-Dithio-thymidin

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
(Eingegangen am 13. Oktober 1970)

2-Thio-thymidin-5'-phosphat (**3**), 2.4-Dithio-thymidin-5'-triphosphat (**8c**), 2.4-Dithio-uridin-5'-diphosphat (**7a**), 2.4-Dithio-ribothymidin-5'-diphosphat (**7b**) und 2.4-Dithio-uridin-5'-triphosphat (**8a**) wurden synthetisiert. Als Reinheitskriterien dienen das Verhalten in Papierchromatographie sowie Papierelektrophorese und der Phosphatgehalt.

The Chemical Synthesis of 2.4-Dithiopyrimidine Nucleoside-5'-mono- and -polyphosphates

The synthesis of 2-thiothymidine-5'-phosphate (**3**), 2.4-dithiothymidine-5'-triphosphate (**8c**), 2.4-dithiouridine-5'-diphosphate (**7a**), 2.4-dithioribothymidine-5'-diphosphate (**7b**), and 2.4-dithiouridine-5'-triphosphate (**8a**) is reported. The behaviour in paper chromatography and paper electrophoresis as well as the phosphate content have been used as criteria of the purity.

Kürzlich haben wir über die enzymatische Synthese von Polynucleotiden berichtet, welche 4-Thio-uridylsäure^{1,2,3}) oder 4-Thio-thymidylsäure⁴) enthalten. Die teilweise ungewöhnlichen physikalischen^{5,2,4}) und biologischen Eigenschaften dieser Polynucleotide haben ihre Ursache möglicherweise sowohl in den geringen Wasserstoffbrücken-Acceptoreigenschaften der 4-Thioxogruppen als auch in der Fähigkeit der 4-Thio-pyrimidinnucleotide, die anomale *syn*-Konformation einzunehmen^{6,7}). Deshalb erschien uns die enzymatische Synthese von 2.4-Dithio-pyrimidin-Polynucleotiden sehr vielversprechend, da im 2.4-Dithio-uridin beide Uracil-ketogruppen als H-Brücken-Acceptoren ausfallen und überdies der Nachweis erbracht wurde, daß dieses Nucleosid die normale *anti*-Konformation besitzt⁸). Für die beabsichtigte enzymatische Poly-2.4-dithio-pyrimidinnucleotid-Synthese war die Darstellung der 5'-Mono-, 5'-Di- und 5'-Triphosphate von 2.4-Dithio-uridin, 2.4-Dithio-ribothymidin,

1) K. H. Scheit und E. Gaertner, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **182**, 1 (1969).

2) J. Simuth, K. H. Scheit und E. M. Gottschalk, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **204**, 371 (1970).

3) F. Eckstein und K. H. Scheit in *Procedures in Nucleic Acids Research* (G. L. Cantoni and D. R. Davies edit.), Vol. II, Harper and Row, New York and London, im Druck.

4) A. G. Lezius und K. H. Scheit, *Europ. J. Biochem.* **3**, 85 (1967).

5) K. H. Scheit und E. Gaertner, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **182**, 10 (1969).

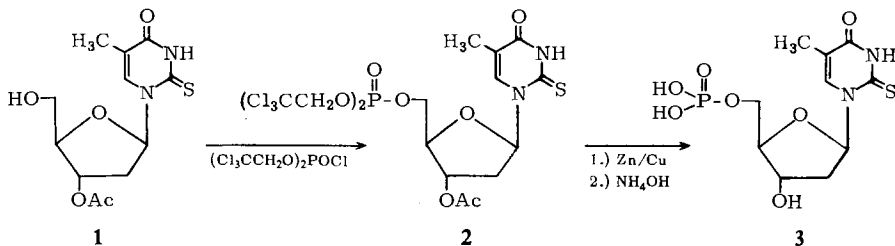
6) W. Saenger und K. H. Scheit, *J. molecular Biol.* **50**, 153 (1970).

7) K. H. Scheit und W. Saenger, *FEBS-Letters* **2**, 305 (1969).

8) P. Faerber, W. Saenger, D. Suck und K. H. Scheit, *FEBS-Letters* **10**, 41 (1970).

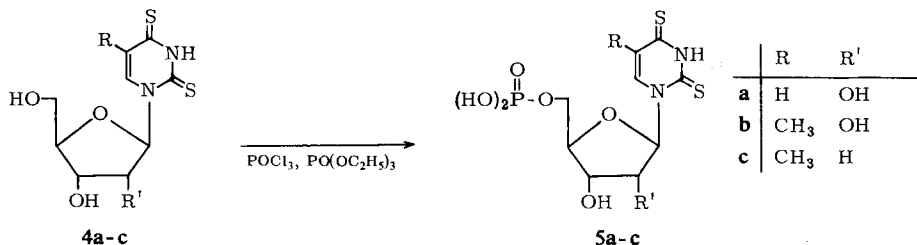
2,4-Dithio-thymidin und 2-Thio-thymidin erforderlich. Im folgenden berichten wir über die Synthese der genannten Verbindungen aus den bereits bekannten Nucleosiden⁹⁾.

Reaktion von 3'-*O*-Acetyl-2-thio-thymidin (**1**) mit Phosphorsäure-bis-[β . β . β -trichlor-äthylester]-chlorid in Pyridin führte mit einer Ausbeute von 73% zum Triester **2**, der durch Behandeln mit Zn/Cu in DMF und anschließende ammoniakalische Hydrolyse zu 2-Thio-thymidin-5'-phosphat (**3**) gespalten wurde. Das analytisch reine Nucleotid **3** wurde durch Kieselgelschichtchromatographie mit 43% Ausbeute erhalten.



Eine Anwendung dieser Phosphorylierungsmethode auf 2,4-Dithio-pyrimidin-nucleoside war nicht möglich, da bei der Behandlung mit Zn/Cu die 4-Thioxogruppe reduziert wurde.

Wesentlich erfolgreicher gelang die Phosphorylierung dieser Nucleoside mit POCl_3 in Triäthylphosphat nach *Yoshikawa et al.*¹⁰⁾.



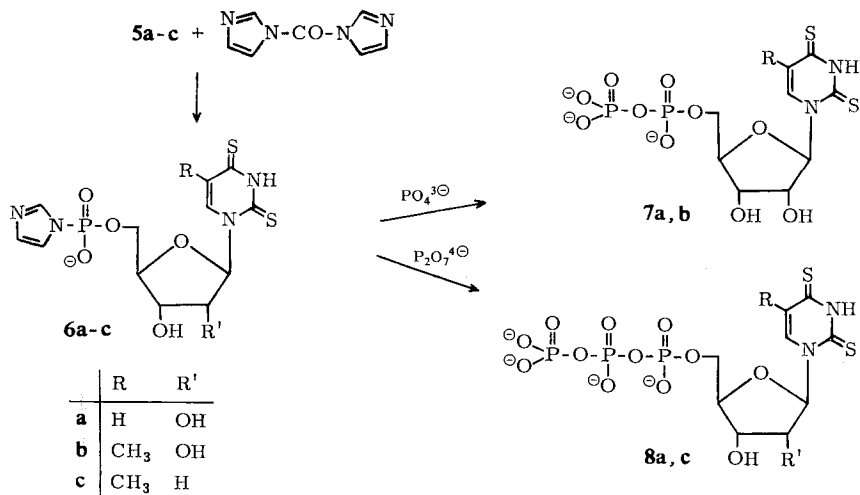
Die Isolierung der Nucleotide **5a** und **b** erfolgte durch Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose (Ausb. 50–55%). **5c** konnte nur in einer Ausbeute von 10% gewonnen werden, da unter den sauren Reaktionsbedingungen die glykosidische Bindung in größerem Maße gespalten wurde. Die Suche nach einer ergiebigeren Darstellungsweise für **5c** ist noch im Gange.

Die Nucleotide **5a–c** wurden durch Reaktion mit *N,N'*-Carbonyl-diimidazol¹¹⁾ *in situ* in die entsprechenden Nucleotidimidazole **6a–c** übergeführt. Aus diesen wurden durch Umsetzung mit Tris(tributylammonium)-phosphat oder Tetrakis(tributylammonium)-pyrophosphat die entsprechenden Nucleosid-5'-di- (**7a, b**) oder -triphosphate (**8a, c**) erhalten.

⁹⁾ P. Faerber und K. H. Scheit, Chem. Ber. **103**, 1307 (1970).

¹⁰⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 5065.

¹¹⁾ F. Cramer und H. Neunhoeffer, Chem. Ber. **95**, 1664 (1962).



Alle Nucleosid-5'-polyphosphate wurden durch Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose isoliert. Die Ausbeuten variierten dabei von 20–50%, bezogen auf eingesetztes Nucleotid. Die Substanzen wurden durch Papierchromatographie, Papierelektrophorese, Phosphatanalyse und UV-Spektren charakterisiert. Über die Eigenschaften der dargestellten Verbindungen als Substrate für Polynucleotid-Phosphorylase¹²⁾, DNS-Polymerase und RNA-Polymerase wird an anderer Stelle berichtet.

Wir danken Herrn Professor Dr. F. Cramer für die wohlwollende Unterstützung sowie Herrn R. Rackwitz für intelligente und fleißige Mithilfe. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte diese Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

UV-Spektren wurden mit dem Gerät Cary 14 aufgenommen. Zur Kieselgelschichtchromatographie wurde Silicagel PF₂₅₄ (E. Merck AG) benutzt.

2,4-Dithio-uridin (**4a**)¹³⁾, 2,4-Dithio-ribothymidin (**4b**)⁹⁾, 2,4-Dithio-thymidin (**4c**)⁹⁾ und 3'-O-Acetyl-2-thio-thymidin (**1**)⁹⁾ wurden nach der Literatur bereitet.

Papierchromatographie erfolgte absteigend an Papier Schleicher und Schüll, 2040 a (gewaschen) in den folgenden Lösungsmittelsystemen:

- A) Isopropylalkohol/gesätt. wäbr. (NH₄)₂SO₄/H₂O (2 : 79 : 19, v/v),
- B) Äthanol/*m* CH₃CO₂NH₄ (7 : 3, v/v).

Papierelektrophorese wurde auf Papier Schleicher und Schüll 2040 a (gewaschen) bei 15 V/cm in den folgenden Puffern durchgeführt:

- C) 0.05 *m* Natriumpyrophosphat, pH 10.5,
- D) 0.05 *m* Ammoniumformiat, pH 3.5,
- E) 0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat, pH 8.2.

¹³⁾ T. Ueda, Y. Iida, K. Ikeda und Y. Mizuno, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **16**, 1788 (1968).

Zur Phosphatanalyse wurde die kolorimetrische Methode von *Hurst* und *Becking*¹⁴⁾ benutzt. Dazu wurden die dargestellten Nucleotide und Nucleosidphosphate mit alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1) Fa. Böhlinger, Mannheim, inkubiert.

2-Thio-thymidin-5'-phosphat (**3**): 0.25 g (0.83 mMol) *3'-O-Acetyl-2-thio-thymidin* (**1**) wurden durch Abdampfen mit Pyridin wasserfrei gemacht. Der Rückstand wurde in 15 ccm absol. Pyridin mit 0.91 g (2.46 mMol) *Phosphorsäure-bis-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-chlorid* bei 0° versetzt. Nach 48 Stdn. wurde eingengt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mehrmals mit 2 *m* NaHCO₃ gewaschen. Die Chloroform-Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt und der Kieselgelschichtchromatographie mit Chloroform als Lösungsmittel unterworfen. Der Inhaltsstoff der am schnellsten wandernden Zone wurde mit CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) eluiert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand, 390 mg (73%) **2**, in 20 ccm DMF gelöst. Die Lösung wurde mit 0.5 g *Zn/Cu* 30 Min. auf 50° erwärmt. Danach filtrierte man, engte das Filtrat bei 0.1 Torr/30° ein und löste in 2 *n* NH₄OH. Zur Fällung der Zink-Ionen wurde H₂S eingeleitet. Das ausgefallene ZnS wurde abfiltriert, das Filtrat 2 Stdn. bei Raumtemp. belassen und danach eingengt. **3** wurde durch Kieselgelschichtchromatographie mit Isopropylalkohol/0.5 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat (5:2, v/v) isoliert. Die am langsamsten wandernde Zone wurde mit Wasser eluiert. In die wäßrige Lösung wurde DEAE-Cellulose eingerührt, um **3** zu adsorbieren. Die Cellulose wurde abgesaugt und **3** mit 0.5 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat eluiert. Das Eluat engte man zur Trockne ein und fällte das Natriumsalz von **3** aus wenig Methanol durch Zugabe einer 1proz. Lösung von NaClO₄ in Aceton. Ausb. 0.35 mMol (5800 OD-Einheiten (276 m μ), 43%). Verhältnis 2-Thio-thymidin : P = 1.05. — UV (Wasser, pH 7): λ_{\max} 276 (ϵ 1.6 · 10⁴), 220 m μ (ϵ 1.57 · 10⁴).

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der 2,4-Dithio-pyrimidinnucleotide 5a—c: Zu 1 mMol Nucleosid in 2.5 ccm Triäthylphosphat wurde bei 0° 1 ccm (1.67 g = 11 mMol) POCl₃ gegeben. Die Reaktion erfolgte man durch Kieselgel-Dünnschichtchromatographie in Chloroform/CH₃OH (85:15, v/v). Nach 3 Stdn. bei 3—5° wurde das Reaktionsgefäß 20 Min. bei 0.1 Torr evakuiert, wodurch ein Teil des überschüssigen POCl₃ entfernt wurde. Nach Zugabe von Eis wurde 30 Min. bei 5° stehengelassen, das Wasser schonend abgedampft und Triäthylamin bis zur alkalischen Reaktion zugegeben. Vom abgeschiedenen gelartigen Niederschlag wurde dekantiert und aus wenig Methanol mit einer 1proz. Lösung von NaClO₄ in Aceton gefällt. Die Natriumsalze wurden abgesaugt, mit Aceton gewaschen und in wenig Wasser auf eine DEAE-Cellulosesäule (3.5 × 70 cm) aufgegeben. Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3 l 0.4 *m* [(C₂H₅)₃NH]HCO₃ im Vorratsgefäß, 3 l Wasser im Mischgefäß). Fraktionen, die Nucleotid enthielten, wurden vereinigt und bei 15° unter vermindertem Druck eingengt. Die Nucleotide wurden durch Fällen mit NaClO₄ in Aceton in die amorphen Natriumsalze übergeführt (Tab. 1).

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der 2,4-Dithio-pyrimidinpolyphosphate 7a, b und 8a, c: Die Triäthylammonium-nucleosid-5'-phosphate (Salze von 5a—c) wurden durch Abdestillieren mit Pyridin wasserfrei gemacht und in DMF (1 mMol/5 ccm DMF) mit 2 Äquivalenten *N,N'-Carbonyl-dimidazol* umgesetzt. Die Imidazolid-Bildung (**6a—c**) kontrollierte man durch Kieselgel-Dünnschichtchromatographie in Isopropylalkohol/0.5 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat (9:2, v/v). Nach etwa 30 Min. gab man entweder 5 Äquivv. *Tris(tributylammonium)-phosphat* oder *Tetrakis(tributylammonium)-pyrophosphat* (1 mMol/2 ccm DMSO) zu und ließ 15—20 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Die Lösungsmittel wurden danach weitgehend bei 0.1 Torr/30° abdestilliert und der Rückstand in Wasser auf eine DEAE-Cellulosesäule gegeben. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogen-

¹⁴⁾ R. O. Hurst und G. C. Becking, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **41**, 469 (1963).

carbonat (0–0.5 m). Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und bei 15° unter vermindertem Druck eingengt. Den Rückstand nahm man in wenig Methanol auf und fällte die *Natriumsalze* durch Eintropfen in eine 1proz. Lösung von NaClO_4 in Aceton. Die amorphen Niederschläge wurden gesammelt, mit Aceton gewaschen und i. Vak. getrocknet (Tab. 2).

Tab. 1. Darstellung der 2,4-Dithio-pyrimidinnucleotide **5a–c**

Syntheseprodukt	Ansatz	Ausbeute	Verhältnis Nucleosid: P	UV-Spektrum (Wasser, pH 5.5)
5a	276 mg (1 mMol) 4a	1.07×10^4 OD-Einheiten (280 m μ)	1:1.06	λ_{max} 340 m μ (ϵ $1 \cdot 10^4$); 280 m μ (ϵ $1.8 \cdot 10^4$)
	1.67 g (11 mMol) POCl_3	(0.52 mMol, 52%)		
5b	61.8 mg (0.21 mMol) 4b	2.3×10^3 OD-Einheiten (280 m μ)	1:0.93	λ_{max} 340 m μ (ϵ $1 \cdot 10^4$); 283 m μ (ϵ $1.97 \cdot 10^4$)
	0.416 mg (2.7 mMol) POCl_3	(0.12 mMol, 56%)		
5c	1.83×10^4 OD-Einheiten (280 m μ)	1820 OD-Einheiten (280 m μ)	1:0.92	λ_{max} 345 m μ (ϵ $1 \cdot 10^4$); 280 m μ (ϵ $2.08 \cdot 10^4$)
	(0.92 mMol) 4c	(0.092 mMol, 10%)		
	1.67 g (11 mMol) POCl_3			

Tab. 2. Darstellung der 2,4-Dithio-pyrimidinnucleosidpolyphosphate **7a, b** und **8a, c**

Syntheseprodukt	Ansatz	Ausbeute	Verhältnis Nucleosid: P	UV-Spektrum (Wasser, pH 5.5)
7a	2.0×10^4 OD-Einheiten (280 m μ) (1 mMol) 5a ; 334 mg (2 mMol) Carbonyldiimidazol; 5 mMol Tris(tributylammonium)-phosphat	1.04×10^4 OD-Einheiten (280 m μ) (0.52 mMol, 52%)	1:2.2	λ_{max} 340 (ϵ $1 \cdot 10^4$), 330 m μ (ϵ $1.82 \cdot 10^4$)
7b	1.794×10^3 OD-Einheiten (280 m μ) (0.095 mMol) 5b ; 31.8 mg (0.19 mMol) Carbonyldiimidazol; 4.8 mMol Tris(tributylammonium)-phosphat	360 OD-Einheiten (280 m μ) (0.019 mMol, 20%)	1:1.95	λ_{max} 340 (ϵ $1 \cdot 10^4$), 280 m μ (ϵ $2 \cdot 10^4$)
8a	10^4 OD-Einheiten (280 m μ) (0.5 mMol) 5a ; 167 mg (1 mMol) Carbonyldiimidazol; 2.5 mMol Tetrakis(tributylammonium)-pyrophosphat	2780 OD-Einheiten (280 m μ) (0.139 mMol, 27.8%)	1:2.90	λ_{max} 340 (ϵ $1 \cdot 10^4$), 280 m μ (ϵ $1.85 \cdot 10^4$)
8c	200 OD-Einheiten (280 m μ) (10 μ Mol) 5c ; 16.4 mg (0.1 mMol) Carbonyldiimidazol; 0.05 mMol Tetrakis(tributylammonium)-pyrophosphat	63 OD-Einheiten (280 m μ) (3.1 μ Mol, 31.4%)	1:2.95	λ_{max} 345 (ϵ $1 \cdot 10^4$), 280 m μ (ϵ $2.1 \cdot 10^4$)

Tab. 3. Relative R_F -Werte in der Papierchromatographie und Wanderungsgeschwindigkeiten bei der Elektrophorese

Substanz	Papierchromatographie System		Elektrophorese Puffer		
	A	B	C	D	E
Uridin	1.0	1.0	0.62	0.44	0.43
Uridin-5'-phosphat	1.2	0.5	1.0	1.0	1.0
Uridin-5'-diphosphat	1.22	0.35	1.1	1.05	1.12
4a 2,4-Dithio-uridin	0.29	0.98	0.6	0.45	0.65
5a 2,4-Dithio-uridin-5'-phosphat	0.49	0.5	1.2	0.84	1.18
7a 2,4-Dithio-uridin-5'-diphosphat	0.61	0.37	1.3	1.17	1.2
8a 2,4-Dithio-uridin-5'-triphosphat	0.71	0.08	—	1.47	—
4b 2,4-Dithio-ribothymidin	0.15	0.63	0.6	0.23	—
5b 2,4-Dithio-ribothymidin-5'-phosphat	0.38	0.37	0.93	0.8	1.0
7b 2,4-Dithio-ribothymidin-5'-diphosphat	0.42	0.15	1.18	1.31	1.05
4c 2,4-Dithio-thymidin	—	1.03	—	—	0.54
5c 2,4-Dithio-thymidin-5'-phosphat	—	0.62	—	—	1.02
8c 2,4-Dithio-thymidin-5'-triphosphat	—	0.1	—	—	1.3