

GLUCOSIDIERUNG DES 6-FLUORTHYMINS* **

D.BÄRWOLFF, G.KOWOLLIK und P.LANGEN

Zentralinstitut für Molekularbiologie,
Akademie der Wissenschaften der DDR, DDR-Berlin-Buch

Eingegangen am 22 Juni 1973

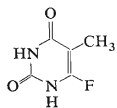
Die Glucosidierung des Silyl-Derivates *II* des 6-Fluorthymins (*I*) mit α -Acetobromglucose führt zum 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-fluorthymin (*III*), dessen Struktur unter anderem durch Umsetzung mit Na-S-C₂H₅ zu 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-äthylmercaptthymin (*IV*) und nachfolgende Hydrierung zu 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-thymin (*V*) bewiesen wird. *III* setzt sich als vinyloges Säurefluorid mit Nucleophilen zu entsprechenden 6-substituierten Pyrimidin-N-1-6-Nucleosiden *IV*, *VI*, *VII* um. UV- und NMR-Spektren werden diskutiert.

Das vor einiger Zeit dargestellte 6-Fluorthymin¹ (*I*) stellt eine interessante Fluorpyrimidin-Komponente für die Synthese neuer modifizierter Nucleoside dar. 6-Fluor-substituierte Pyrimidinnucleoside sind bisher nicht bekannt, als potentielle Antimetabolite des Nucleinsäurestoffwechsels aber von Interesse. Ziel unserer Arbeit war, die Glucosidierung von *I* bezüglich der Wahl des günstigsten Glucosidierungsverfahrens und vor allem bezüglich des Ortes der Glucosidierung an *I* (N - 3 oder N - 1) modellmäßig zu untersuchen. Als Zuckerkomponente wählten wir für diese Untersuchung α -Acetobromglucose.

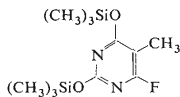
Verfahrensmäßig erwies sich auch bei uns zur Glucosidierung von *I* die Silyl-Methode⁹ auf Grund der günstigen Variabilität der Reaktionsbedingungen und den guten Ausbeuten als Methode der Wahl. *I* geht mit Hexamethyldisilazan unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß in das destillierbare 2,4-Bis-O-trimethylsilyl-5-methyl-6-fluorpyrimidin (*II*) über. Da bei der Umsetzung Ammoniak entsteht, wird bei längerer Reaktionszeit unter Substitution des 6-Fluor-Atoms in *II* in zunehmendem Maße das Tris-trimethylsilyl-Derivat des 6-Aminothymins¹⁰ gebildet, so daß man die Reaktionszeit zweckmäßig auf 8 - 10 Std. begrenzt. *II* ist stark feuchtigkeitsempfindlich. Seine molekulare Zusammensetzung konnte aber massenspektrometrisch eindeutig gesichert werden. Das UV-Maximum von 244 nm weist klar auf das Vorliegen der Dilactimform hin. Bei der Hydrolyse von *II* wird analysenreines *I* zurückerhalten.

* I. Mitteilung in der Reihe 6-Substituierte Pyrimidin-N-nucleoside.

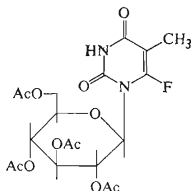
** Teilweise vorgetragen auf dem 2nd Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components, Liblice, September 1972.



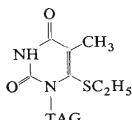
I



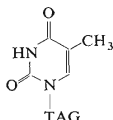
II



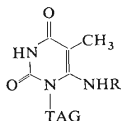
III



IV

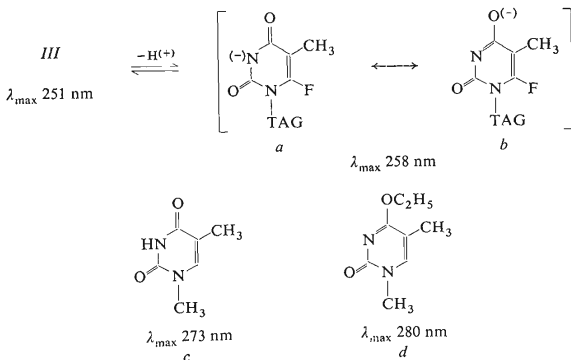


V



VI, R = H
VII, R = CH₂C₆H₅

Ac = Acetyl; TAG = Tetra-O-acetylglucopyranosyl



Frühere Versuche zur Glykosidierung 6-substituierter Uracile, sowohl nach der Hg-Salz-Methode^{2,3} als auch nach dem Silyl-Verfahren³⁻⁶ führten überwiegend zu N-3-Glykosiden. So erhielten Pichat and Chatelain⁷ durch Kondensation von 2,4-Bis-O-trimethylsilyl-6-chlorpyrimidin (dem zu I chloranalogen Silyl-Derivat) und 1-Chlor-2,3,5-tribenzoylribofuranose ausschließlich 3-(2,3,5-Tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-6-chloruracil. Kürzlich berichteten Niedballa und Vorbrüggen⁸, daß die Glykosidierung 6-substituierter Uracile nach einem modifizierten Silyl-Verfahren⁹ bei Anwendung polarer Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) überwiegend zu N-1-Nucleosiden führt.

Wird *II* mit α -Acetobromglucose in 1,2-Dichloräthan in Gegenwart katalytischer Mengen SnCl_4 umgesetzt, so erhält man in 75proz. Ausbeute ein Nucleosid, das im pH-Bereich 1–7 ein UV-Maximum von 251 nm aufweist. Bei höheren pH-Werten verschiebt sich das Maximum zunehmend bathochrom und liegt bei pH 14 bei 257 nm. Dieses Verhalten unterscheidet das neue Nucleosid wesentlich von analogen N-1-Nucleosiden, wie 1-(β -D-Glucopyranosyl)-thymine¹¹ oder Thymidine¹² und spricht zunächst für eine N-3-Glucosidierung. Dagegen weist der relativ hohe pK-Wert von 8,5 eher auf eine N-1-Glucosidierung, da der pK-Wert eines N-3-Glucosids von *I* nicht wesentlich vom pK-Wert von *I* selbst (4,8) abweichen sollte. Auch das NMR-Spektrum spricht für ein N-1-Nucleosid. Es zeigt ein N—H-Signal bei 12,4 p.p.m., das gegenüber dem N-1-Proton von *I* um 1,2 p.p.m. nach höherem Feld verschoben ist. Da das N-1-Proton von *I* kernresonanzspektroskopisch nur in wasserfreiem Hexadeuteriodimethylsulfoxid nachweisbar ist, das N—H-Signal des neuen Nucleosids aber wie auch das N-3-Proton-Signal von *I* auch bei einem Wassergehalt von über 1% in Hexadeuteriodimethylsulfoxid registrierbar ist, sollte es sich im neuen Nucleosid ebenfalls um das N-3-Proton handeln. Die Kopplungskonstante $J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$, 9,5 Hz (δ_{H_1} , 6,30 p.p.m.) weist klar auf das Vorliegen eines reinen β -Nucleosids hin. Aus der Linienbreite des H_1 -Signals ergibt sich ein „long range coupling“ von $J_{\text{H}_1, \text{F}}$ ca. 1 Hz.

Über chemische Abwandlungen haben wir schließlich indirekt einen klaren Strukturbeweis geführt. Bei Umsetzung des neuen Nucleosids mit Na-äthylmercaptid in Dioxan wird das Fluor-Atom im Heterocyclus nucleophil durch die Äthylmercaptogruppe substituiert, die ihrerseits mit Raney-Nickel in Methanol leicht entfernt werden kann. Das so erhaltene Produkt ist identisch (UV, Dünnschichtchromatographie, Schmelzpunkt) mit authentischem¹¹ 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-thymine (*V*). Damit war der schlüssige Beweis erbracht, daß es sich bei dem Umsetzungsprodukt von *II* mit α -Acetobromglucose tatsächlich um das N-1-Nucleosid, 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-fluorthymine (*III*), handelt, dessen Umsetzung mit Na-äthylmercaptid zu 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-äthylmercaptothymine (*IV*) führt. Versuche, *V* direkt aus *III* durch katalytische Hydrierung (über Pd, Pt oder Ni) oder Umsetzung mit komplexen Hydriden zu gewinnen, führten nicht zum Ziel.

Beweiskräftig für die Struktur von *III* ist weiterhin dessen Umsetzung mit Ammoniak, die (unter gleichzeitiger Entacetylierung) zu 1-(β -D-Glucopyranosyl)-6-aminothymine führt. Nach dessen Acylierung mit Pyridin-Acetanhydrid erhält man das 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-aminothymine (*VI*), das wir früher¹⁰ durch Cyclokondensation von 3-(α -Cyano-propionyl)-1-(tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-harnstoff mit K-tert-Butylat erhalten hatten. Analog geht *III* mit Benzylamin in 1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-benzylaminothymine (*VII*) über. Die mit diesen Umsetzungen zugleich nachgewiesene leicht erfolgende nucleophile Substitution des 6-Fluor-Atoms in *III* durch eine Vielzahl von Nucleophilen (Amine, Sulfide,

Wasser) erschwert jedoch die Entacetylierung von *III*. Diese gelingt nur bei sorgfältig kontrollierter protonenkatalysierter Umesterung in Methanol und führt in 60proz. Ausbeute zu 1-(β -D-Glucopyranosyl)-6-fluorthymin (*VIII*). Dagegen ist es uns bisher nicht gelungen, die zu *III* analogen N-1-Nucleoside 1-(2-Desoxy-3,5-di-O-*p*-nitrobenzoyl- β -D-ribofuranosyl)-6-fluorthymin und 1-(2-Desoxy-3,5-di-O-*p*-toluyl- β -D-ribofuranosyl)-6-fluorthymin unter diesen Bedingungen in die ungeschützten Nucleoside zu überführen.

Die ausschließliche Bildung des N-1-Nucleosids bei der Kondensation von *II* mit α -Acetobromglucose erscheint zunächst überraschend. Bekanntlich spielen aber sterische Faktoren bei Nucleosid-Kondensationen eine entscheidende Rolle¹³. Offensichtlich behindert das gegenüber dem Chlor-Atom in 6-Chloruracil kleinere Fluor-Atom in *I* die Glykosidierung am N-1 nicht. Dagegen wirken sich die elektronischen Einflüsse der Pyrimidinbasen nur wenig aus^{13,14} denn die *pK*-Werte (in Klammern) von *I* (4,8) und 6-Chloruracil¹⁵ (5,67) sind recht ähnlich. Die bei *III* beobachtete, für ein N-1-Nucleosid ungewöhnliche bathochrome Verschiebung des UV-Maximums bei höheren pH-Werten scheint mit dem relativ niedrigen *pK*-Wert für eine N-3-H-Ionisation in *III* im Zusammenhang zu stehen. 1-Substituierte Thymine, z.B. Thymidin mit einem *pK*-Wert von 10, zeigen keine derartige Verschiebung des UV-Maximums¹². Der vom 6-Fluoratom in *III* ausgeübte „nonclassical long range inductive effect“¹⁶ wirkt offenbar über das vinyloge System auf das N-3 und ist wahrscheinlich für die Erhöhung der N-3-Ionisation verantwortlich. Die pH-abhängige Verschiebung des UV-Maximums von 7 nm dürfte in der Ausbildung eines mesomeriestabilisierten Anions [*a* \leftrightarrow *b*] seine Ursache haben. Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit Strukturuntersuchungen von Wittenburg¹⁷, der eine ähnliche Verschiebung für das in seiner Struktur festgelegte N,5-Dimethyl-4-äthoxy-2(1*H*)-pyrimidinon [*d*] gegenüber 1-Methylthymidin [*c*] fand.

EXPERIMENTELLER TEIL

Schmelzpunkte wurden auf dem Mikro-Heiztisch Boëtius bestimmt und sind korrigiert. UV-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer Beckman DK-2 A und dem Unicam SP 800 gemessen, Massenspektren mit dem doppelfokussierenden Gerät MS 902 der Fa. AEI (Manchester) aufgenommen. *pK*-Werte wurden spektroskopisch bestimmt¹⁸. NMR-Spektren wurden mit dem Gerät KRH-100 (Akademiewerkstätten Berlin) in Hexadeuterodimethylsulfoxid (Tetramethylsilan als interner Standard) aufgenommen. Elementaranalysen wurden mit dem Perkin - Elmer Elemental Analyzer 240 ausgeführt.

2,4-Bis-O-trimethylsilyl-5-methyl-6-fluorpyrimidin (*II*)

20 g *I* werden mit 5 ml Dimethylformamid und 60 ml Hexamethyldisilazan 10 Std. bei 150°C im Ölbad unter Rückfluß erhitzt. Danach wird im Vakuum eingengt und anschließend *II* bei 125°C/15 Torr destilliert. Ausbeute 25 g (62%) Öl. C₁₁H₂₁FN₂O₂Si₂ (288,3) Molekulargewicht und Summenformel wurden massenspektrometrisch gesichert. UV (Petroläther): λ_{\max} 244 nm; λ_{\min} 227,5 nm.

1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-fluorthymin (*III*)

3 g (10,4 mmol) *II* in 250 ml 1,2-Dichloräthan werden mit 4,1 g (10 mmol) α -Acetobromglucose und 0,1 ml SnCl_4 versetzt. Nach 5 Std. Stehen bei Raumtemperatur wird die Lösung mit wäßrigem NaHCO_3 extrahiert, über Celite filtriert und getrocknet (Na_2SO_4). Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand durch Verreiben mit Äthylacetat-Petroläther zur Kristallisation gebracht. Ausbeute 3,5 g (75%), F. 202°C (Äthanol). $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_{11}$ (474,4) Berechnet: 48,10% C, 4,89% H, 5,91% N, 4,01% F; Gefunden 48,28% C, 5,02% H, 5,87% N, 4,01% F. UV (pH 1–7): λ_{max} 251 nm (ϵ (pH 7) 4670); λ_{min} 229 nm. (pH 14): λ_{max} 258 nm; λ_{min} 241 nm.

1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-äthylmercaptathymin (*IV*)

470 mg (1 mmol) *III* werden in 20 ml Dioxan mit 200 mg (2,4 mmol) Na-äthylmercaptid versetzt und 2 Std. auf 60°C erwärmt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, mit 2N- H_2SO_4 und mit wäßrigem NaHCO_3 extrahiert und getrocknet (Na_2SO_4). Nach dem Verdampfen des Chloroforms wird aus Äthylacetat-n-Hexan umkristallisiert. Ausbeute 380 mg (74%), F. 144°C. $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$ (516,5) Berechnet: 48,83% C, 5,47% H, 5,43% N, 6,20% S. Gefunden: 49,07% C, 5,47% H, 5,73% N, 6,20% S. UV (Methanol): λ_{max} 270 nm, λ_{min} 237 nm.

1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thymin (*V*)

260 mg (0,5 mmol) *IV* werden in 10 ml Methanol mit 2 g frisch vorbereitetem Raney-Nickel 1 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Filtrieren fallen beim Einengen im Vakuum Kristalle aus. Ausbeute 100 mg (43%), F. 156°C (Methanol) (Lit.¹¹ 156–158°C). UV (Methanol): λ_{max} 263 nm. [NMR: δ 5,72 p.p.m. (d, H_1); $J_{\text{H}_1, \text{H}_2'} = 9,0$ Hz.]

1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-aminothymin (*VI*)

470 mg (1 mmol) *III* werden mit 2 ml wasserfreiem Ammoniak in einem Bombenrohr 1 Std. auf 60°C erhitzt. Nach Abdampfen des Ammoniaks wird der Rückstand mittels Acetanhydrid-Pyridin acetyliert. Ausbeute 400 mg (85%), F. 220°C (Äthanol) (Lit.¹⁰ 220°C). $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (471,4) Berechnet: 48,49% C, 5,34% H, 9,81% N; Gefunden: 48,98% C, 5,71% H, 9,75% N. UV (pH 1–11): λ_{max} 280 nm, λ_{min} 244 nm. NMR: δ 6,46 p.p.m. (d, H_1); $J_{\text{H}_1, \text{H}_2'} = 9$ Hz.

1-(Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-6-benzylaminothymin (*VII*)

470 mg (1 mmol) *III* werden mit 0,25 ml (2,5 mmol) Benzylamin in 10 ml Dioxan 1 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand über P_2O_5 und NaOH getrocknet und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 410 mg (73%), F. 134°C. $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (561,5) Berechnet: 55,63% C, 5,57% H, 7,48% N; Gefunden: 55,43% C, 5,55% H, 7,29% N. UV (pH 1–11): λ_{max} 282 nm, λ_{min} 242 nm.

1-(β -D-Glucopyranosyl)-6-fluorthymin (*VIII*)

1 g (2,1 mmol) *III* wird in 100 ml Methanol gelöst, mit 0,5 ml konz. HCl versetzt und 1 Std. unter Rückfluß erhitzt. Der Verlauf der Entacetylierung wird dünnenschichtchromatographisch kontrolliert (Kieselgel-Fertigplatten HF₂₅₄ der Fa Merck; Laufmittel: Äthylacetat–2-Propanol–Wasser (12 : 1 : 6)). Die abgekühlte Lösung wird mit festem Ag_2CO_3 neutralisiert, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel H

(Merck) (1% Beladung) mit Äthylacetat als Laufmittel gereinigt. Ausbeute 390 mg (60%), F. 201°C (Äthanol-Äther). $C_{11}H_{15}FN_2O_7$ (306,3) Berechnet: 43,14% C, 4,94% H, 9,16% N, 6,22% F; Gefunden: 43,10% C, 5,05% H, 8,98% N, 6,00% F. UV (pH 1–7): λ_{\max} 250 nm ($\epsilon = 4950$), λ_{\min} 228 nm; (pH 11): λ_{\max} 257 nm, λ_{\min} 240 nm. NMR: δ 5,93 p.p.m. (d, $H_{1,1}$); $J_{H_{1,1}H_{2,2}} = 9$ Hz.

Dr. G. Etzold, Bereich Methodik und Theorie unseres Instituts, danken wir für wertvolle Anregungen und Diskussionen und für die Durchführung der spektroskopischen Messungen (NMR, MS).

LITERATUR

1. Etzold G., Bärwolff D., Langen P., Cech D., Meinert H.: J. Prakt. Chem. 313 (4), 602 (1971).
2. Curran W. V., Angier R. B.: J. Org. Chem. 31, 201 (1966).
3. Prystaš M., Šorm F.: diese Zeitschrift 34, 2316 (1969).
4. Winkley M. W., Robins R. K.: J. Org. Chem. 33, 2822 (1968); J. Chem. Soc. C 1969, 791.
5. Winkley M. W.: J. Chem. Soc. C 1970, 1869.
6. Wittenburg E.: diese Zeitschrift 36, 246 (1971).
7. Pichat L., Chatelain G.: Bull. Soc. Chim. France 1970, 1833.
8. Niedballa U., Vorbrüggen H.: Vortrag 2nd Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components, Liblice (ČSSR), September 1972.
9. Niedballa U., Vorbrüggen H.: Angew. Chem. 82 (11) 449 (1970).
10. Bärwolff D.: Dissertation. Humboldt-Universität, Berlin 1971.
11. Fox J. J., Yung N., Davoll J., Brown G. B.: J. Am. Chem. Soc. 78, 2117 (1956).
12. Fox J. J., Wempen I.: Advan. Carbohydrate Chem. 14, 309 (1959).
13. Zorbach W.: Synthesis 1970, 329.
14. Pliml J., Prystaš M. im Buche: *Advances in Heterocyclic Chemistry* (A. R. Katritzky, A. J. Boulton, Red.), Vol. 8, S. 115. Academic Press, New York 1967.
15. Wempen I., Fox J. J.: J. Med. Chem. 7, 207 (1964).
16. Staab A. H.: *Einführung in die Theoretische Organische Chemie*, S. 564. Verlag Chemie, Weinheim 1959.
17. Wittenburg E.: Chem. Ber. 99 (7), 2391 (1966).
18. Wittenburg E.: Chem. Ber. 99 (7), 2380 (1966).