

SYNTHESE VON AMINOBIOPTERIN UND AMINONEOPTERIN¹

H. REMBOLD und J. EDER
Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Received in Germany 15 August 1966; accepted for publication 22 August 1966)

Zusammenfassung—Aminobiopterin (2,4-Diamino-6-[L-erythro-1,2-dihydroxypropyl]pteridin), Aminoneopterin (2,4-Diamino-6-[D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl]pteridin) und ihre 7-Isomeren lassen sich durch Kondensation von 2,4,5,6-Tetraminopyrimidin mit 5-Desoxy-L-arabinose bzw. D-Ribose und wiederholte chromatographische Trennung des Rohproduktes auf phosphorylierter Cellulose rein darstellen. Die Verbindungen werden durch ihre UV- und NMR-Spektren charakterisiert. Im Crithidia-Test zeigt Aminobiopterin eine dem Biopterin vergleichbare Wuchsstoffaktivität.

Abstract—Pure aminobiopterin (2,4-diamino-6-[L-erythro-1,2-dihydroxypropyl]pteridine), aminoneopterin (2,4-diamino-6-[D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl]pteridine), and their 7-isomers can be obtained by condensation of 2,4,5,6-tetraminopyrimidin with 5-deoxy-L-arabinose and D-ribose respectively and repeated chromatography of the crude product on phosphorylated cellulose. The substances are characterized by their UV and NMR spectra. In the Crithidia-test aminobiopterin has a growth activity similar to that of biopterin.

HYDRIRTES Biopterin wurde von Kaufman² als Cofaktor der aus Rattenlebern angereicherten Phenylalanin-hydroxylase nachgewiesen. Auch andere mischfunktionelle Oxygenasen werden durch hydrierte Pterine aktiviert.³ Der unterschiedliche Biopterin Gehalt verschiedener Organe der Ratte⁴ und ein gerichteter Einbau der isotope markierten Verbindung in Zellbestandteile⁵ berechtigen zu der Annahme, dass Tetrahydrobiopterin auch in anderen enzymatischen Reaktionen als Wasserstoffdonator wirkt. Ein experimenteller Biopterinmangel lässt sich bei der Ratte weder durch biopterinfreie Ernährung⁶ noch durch 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin⁷ erzeugen. In Analogie zum Aminopterin als Folsäureantagonist⁸ bietet sich 4-Aminobiopterin als eventueller Hemmstoff für Biopterinenzyme an. Da Neopterin⁹ als erstes Folgeprodukt bei der Umwandlung der Purine in die Pterine denkbar ist¹⁰ und daher wahrscheinlich in einem biogenetischen Zusammenhang mit Biopterin steht, ist auch das entsprechende Aminoneopterin als Hemmstoff denkbar.

Aminobiopterin (2,4-Diamino-6-[L-erythro-1,2-dihydroxypropyl]pteridin, II) und Aminoneopterin (2,4-Diamino-6-[D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl]pteridin) werden

¹ Teil der Dissertation J. Eder, Univ. München (1965).

² S. Kaufman, *Proc. Nat. Acad. Sci. Am.* **50**, 1085 (1963).

³ Zusammenstellung: B. Green und H. Rembold, *Chem. Ber.* **99**, 2162 (1966).

⁴ H. Rembold, *Pteridine Chemistry* S. 465. Pergamon Press, Oxford (1964).

⁵ G. Hanser und H. Rembold, *Z. Naturforschung* **19b**, 938 (1964).

⁶ H. Kraut, W. Pabst, H. Rembold und L. Wildemann, *Z. Physiol. Chem.* **332**, 101 (1963).

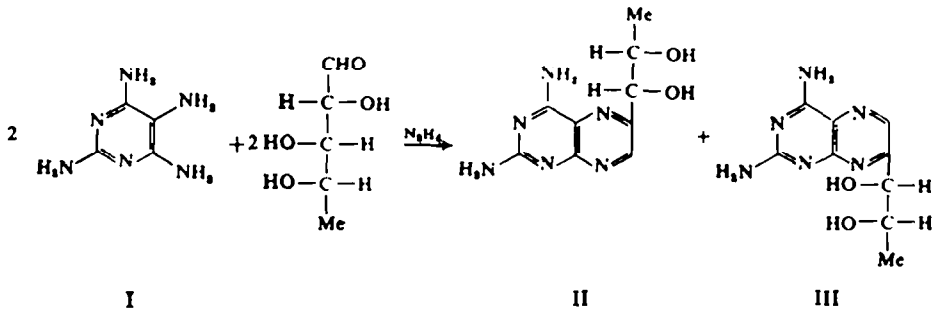
⁷ W. Pabst und H. Rembold, *Z. Physiol. Chem.*, **344**, 107 (1966).

⁸ D. R. Seeger, J. M. Smith Jr. und M. E. Hultquist, *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2567 (1947).

⁹ H. Rembold und L. Buschmann, *Chem. Ber.* **96**, 1406 (1963).

¹⁰ F. Weygand, H. Simon, G. Dahms, M. Waldschmidt, H. J. Schliep und H. Wacker, *Angew. Chem.* **73**, 402 (1961).

durch Kondensation von 2,4,5,6-Tetramino-pyrimidin (I) mit 5-Desoxy-L-arabinoose bzw. mit D-Ribose dargestellt:



Bei der Kondensation haben wir die für die Biopterinsynthese optimalen Bedingungen¹¹ angewandt. Für die Abtrennung des Isomerengemisches II und III wird das gesamte stark wasserlösliche Reaktionsprodukt auf phosphorylierte Cellulose aufgetragen. Mit Wasser wird ein grosser Teil von dunkelbraunen Nebenprodukten aus der Säule gewaschen. Das Isomerengemisch wandert erst mit schwacher Ameisensäure und zeigt damit die gegenüber Biopterin und Neopterin wesentlich basischeren Eigenschaften der Aminoanalogen. Das stark gelb fluoreszierende Gemisch lässt sich sowohl durch oxydativen Abbau der Seitenkette mit alkalischer Permanganatlösung zur entsprechenden 2,4-Diamino-pteridincarbonsäure-6 bzw. -7 als auch durch die charakteristischen UV-Spektren des 6- und 7-Isomeren identifizieren (Abb. 1a und 1b). Für die routinemässige Auswertung der chromatographischen Fraktionen hat sich, wie bei der Synthese des Biopterins^{4,12} und des Neopterins,⁹ ein Vergleich der UV-Extinktionen bei zwei verschiedenen Wellenlängen gut bewährt. Wir verwenden den Quotienten $(\log I_0/I)_{245}/(\log I_0/I)_{335}$, der unter den angewandten Elutionsbedingungen beim 6-Isomeren etwa 1.6, beim 7-Isomeren etwa 1.0 ist (Abb. 2b und 2c) und damit eine gute Identifizierung der beiden Verbindungen erlaubt. Bei Rechromatographie des abgetrennten Isomerengemisches auf P-Cellulose (Abb. 2a) zeigt der Verlauf des Quotienten E_{245}/E_{335} eine Anreicherung des 6-Isomeren am Anfang der Substanzzone. Die gesamte Zone wird nach dem Quotientenverlauf in vier Fraktionen zerlegt und jede Fraktion so oft chromatographiert, bis nach dem Quotienten (Abb. 2b und 2c) und der Permanganatoxydation die Isomeren in reiner Form vorliegen. Bei allen Chromatographien erscheint eine geringe Menge Biopterin bzw. Neopterin vor den Aminoanalogen. Die 4-ständige Aminogruppe wird also selbst unter den schonenden Bedingungen der Reinigung in geringem Masse hydrolysiert.

Die UV-Daten sind für die reinen Isomeren in Tabelle 1 zusammengestellt. Wie bei den entsprechenden 2-Amino-4-hydroxy-pteridinderivaten^{8,9,12} ist das langwellige Maximum des 6-Isomeren gegenüber dem 7-Isomeren schwach bathochrom verschoben. Deutliche Unterschiede zeigen sich auch hier in den Molextinktionen, besonders im kurzwelligen Maximum (Abb. 1). Die Aminoanalogen zeigen im Gegensatz zu den entsprechenden Pterinen beim Messen in Säure ausgeprägte

¹¹ H. Rembold und H. Metzger, *Z. Physiol. Chem.* **329**, 291 (1962).

¹² H. Rembold und H. Metzger, *Chem. Ber.* **96**, 1395 (1963).

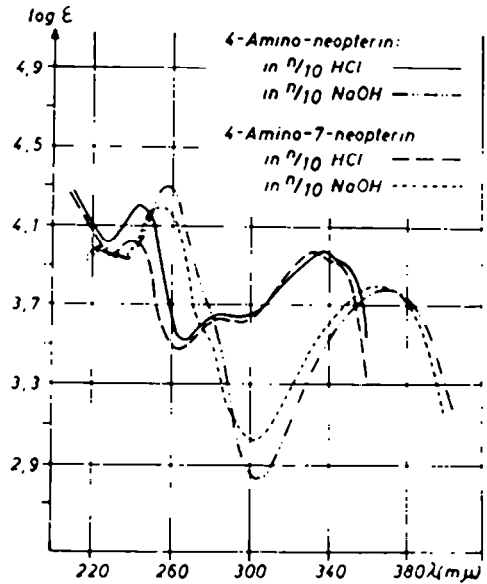
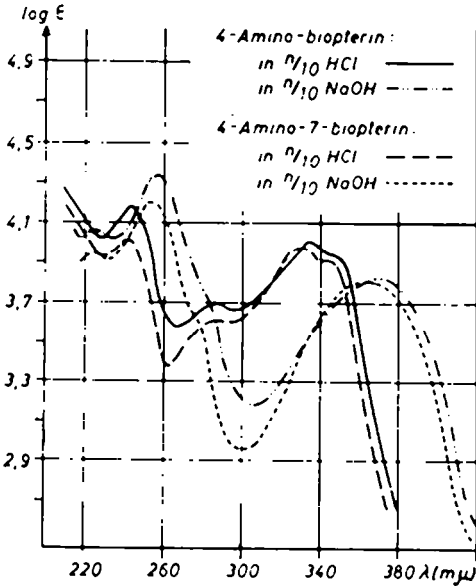


Abb. 1a (links): UV-Spektren von Aminobiopterin und Amino-7-biopterin. Abb. 1b (rechts): UV-Spektren von Aminoneopterin und Amino-7-neopterin.

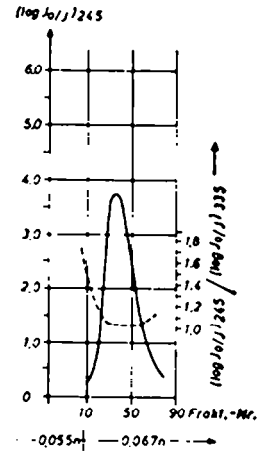
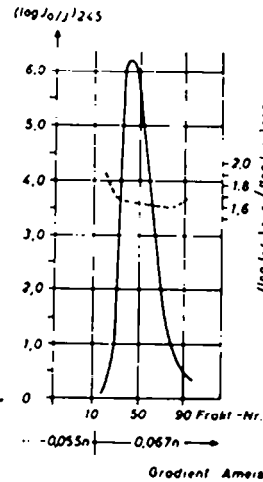
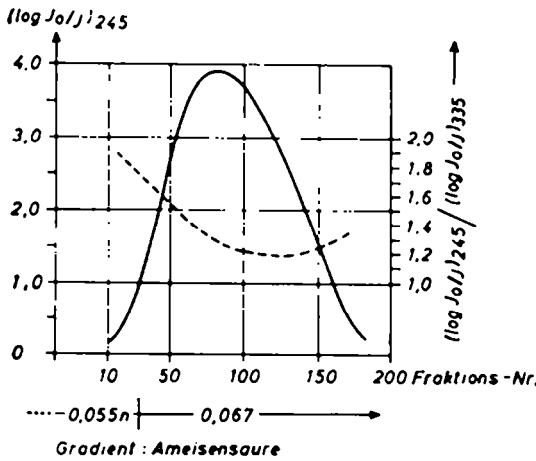


Abb. 2a: Erste Rechromatographie des Aminobiopterin-Rohproduktes auf P-Cellulose. Abb. 2b: Feinreinigung von Aminobiopterin und (Abb. 2c) von Amino-7-biopterin auf P-Cellulose. Nähere experimentelle Einzelheiten vergl. Versuchsteil.

kurzwellige Maxima sowie ein schwächeres Maximum bei 285 mμ, welches bei den Pterinen fehlt. Die Lage der UV-Maxima ist bei Aminobiopterin und Aminoneopterin gleich. Die Spektren zeigen aber in den Molextinktionen geringe Unterschiede, die sich auf den Quotienten E_{245}/E_{285} auswirken. Die Werte sind für Aminobiopterin 1.60, Aminoneopterin 1.64, Amino-7-biopterin 1.01 und Amino-7-neopterin 1.07.

Die NMR-Spektren von Aminobiopterin und Aminoneopterin (Abb. 3a und 3b)

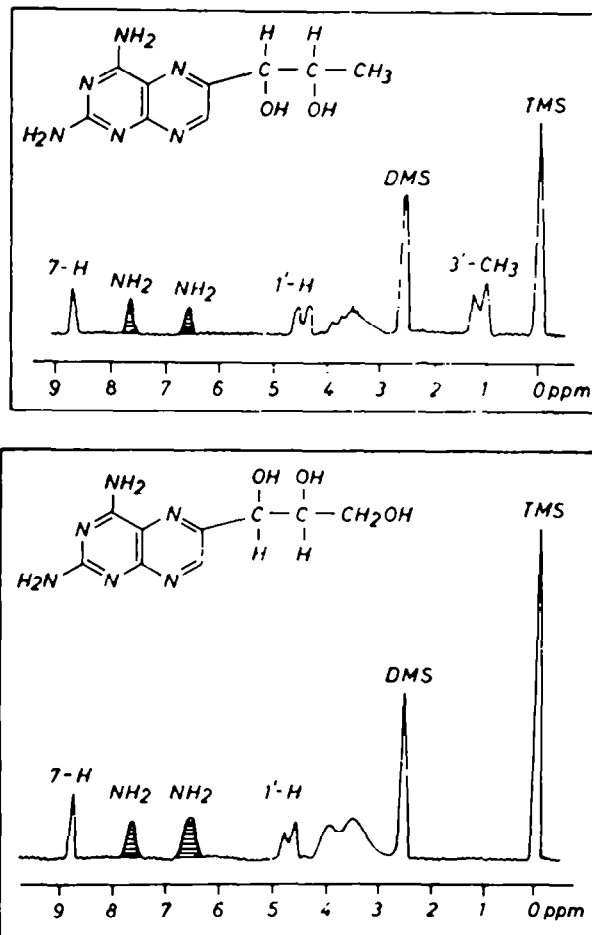


Abb. 3a: NMR-Spektrum von Aminobioperin und (Abb. 3b) von Aminoneopterin, beide gemessen in Dimethylsulfoxyd-D₆. Interner Standard Trimethylchlorsilan (TMS).

liefern einen weiteren Strukturbeweis. Der einzige Wasserstoff am Pteridinring (7-H) zeigt eine Singulett-Absorption der Intensität 1 bei 8.71 bzw. 8.75 ppm. Die beiden Aminogruppen geben breite Signale bei 7.67 und 6.55 bzw. 6.58 ppm; die Protonen sind gegen Deuterium austauschbar. Die Signale dieser Aminogruppen lassen sich nicht mit Sicherheit zuordnen, die Guanidinstruktur am Kohlenstoffatom 2 dürfte aber zu einem schwächeren Elektronensog führen, als es bei der 4-Aminogruppe mit ihrer Amidinstruktur zu erwarten ist. Das bei niedrigerem Feld beobachtete Signal wäre demnach der 4-Aminogruppe zuzuordnen, wofür auch ein Vergleich mit Werten spricht, die v. Philipsborn¹³ und Merlini¹⁴ bei verschiedenen Xanthopterinderivaten gefunden haben. Das Dublett bei 4.50 ppm ($I = 6$ Hz) mit der Intensität 1 ist dem 1'-Proton der Seitenkette zuzuordnen und zeigt im Falle des Aminoneopterins einen starken β -Effekt: durch den elektronenanziehenden

¹³ W. v. Philipsborn, H. Stierlin und W. Traber, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2592 (1963).

¹⁴ L. Merlini, W. v. Philipsborn und M. Viscontini, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2597 (1963).

Einfluss der 3'-OH-Gruppe ist das Dublett mit 4.71 ppm ($I = 6$ Hz) gegenüber Aminobiopterin um 0.21 ppm nach niedrigerem Feld verschoben. Letztere Verbindung zeigt schliesslich durch die Methylgruppe der Seitenkette eine Dublett-Absorption bei 1.12 ppm (3) mit $I = 6$ Hz. Das Spektrum des Amino-7-biopterins zeigt als einzigen bemerkenswerten Unterschied ein Singulett bei 8.47 ppm für den Wasserstoff in 6-Stellung gegenüber 8.71 ppm für das Proton des 6-Isomeren.

Im mikrobiologischen Crithidia-Wachstumstest zeigt Aminobiopterin eine dem Biopterin vergleichbare Wachstumswirkung. Offensichtlich besitzt dieser Organismus eine Desaminase, die eine Umwandlung von Aminobiopterin in Biopterin erlaubt. Ganz analog vermag Crithidia ihren Folsäurebedarf aus Aminopterin zu decken.¹⁶ Die von anderen Autoren¹⁶ beschriebene Hemmwirkung von Aminobiopterin auf das Crithidia-Wachstum dürfte wohl mit einer nicht genügenden Abtrennung von Begleitstoffen aus dem Isomergemisch zu erklären sein.

TABELLE 1. UV-DATEN DER DARGESTELLTEN AMINOANALOGEN UND SPEZ. DREHWERTE VON AMINOBIOPTERIN UND AMINONEOPTERIN, GEMESSEN IN 0.1n HCl

| | 0.1n HCl $\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$ (log ϵ_{\max}) | 0.1n NaOH $\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$ (log ϵ_{\max}) |
|-------------------|--|---|
| Aminobiopterin | 243.5 (4.18) 285.5 (3.68) 336.5 (3.98) (347) (3.92) $[\alpha]_D^{25} -33^\circ$ ($c = 0.16$) | 224 (4.05) 257.5 (4.32) (280) (3.77) 368 (3.82) |
| Amino-7-biopterin | 241 (3.40) 285 (3.59) 333.5 (3.96) (345) (3.91) | 224 (3.93) 255 (4.19) (280) (3.46) 365 (3.80) |
| Aminoneopterin | 243.5 (4.20) 286.5 (3.66) 336.5 (3.98) (348) (3.92) $[\alpha]_D^{25} +23^\circ$ ($c = 0.16$) | 225 (3.98) 257.5 (4.31) (280) (3.70) 369 (3.78) |
| Amino-7-neopterin | 240 (4.02) 284 (3.62) 333 (3.97) (344) (3.92) | 225 (3.97) 254 (4.19) (280) (3.52) 365 (3.81) |

EXPERIMENTELLER TEIL

5-Desoxy-L-arabinose wurde nach in der Literatur beschriebenen Verfahren, ausgehend von L-Arabinose⁸ oder von L-Rhamnose,¹⁷ dargestellt.

Kondensation von 2,4,5,6-Tetraminopyrimidin mit 5-Desoxy-L-arabinose bzw. D-Ribose. In einem 50 ml-Kolben mit Rückflusskühler werden 500 mg (3.7 mMol) 5-Desoxy-L-arabinose mit 560 mg Hydrazinhydrat und 2 ml Wasser 15 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann gibt man 20 ml 20%ige Essigsäure und 890 mg (3.7 mMol) 2,4,5,6-Tetraminopyrimidin-sulfat zu, das durch kräftiges Schütteln rasch in Lösung gebracht werden soll, um die Bildung von Selbstkondensationsprodukten des Pyrimidins möglichst hintanzuhalten. Man hält das Gemisch noch 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad, kühlt dann ab und perforiert die jetzt dunkelrote Lösung zur Entfernung der Essigsäure mindestens 3 Stunden mit Äther. Die neutrale Lösung wird im Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingengt und im Eisschrank gekühlt. Den ockerfarbenen Niederschlag zentrifugiert man ab, wäscht mit Äther und löst ihn noch feucht in Wasser. Die dunkelgelbe Lösung kann nun direkt auf die Säule gegeben werden.

Präparation der Säulen. Die Bereitung der zur präparativen Chromatographie benutzten P-Cellulose-Säulen (Durchmesser 5 cm, Länge 15 cm) muss mit besonderer Sorgfalt und unter Beachtung einiger Kunstgriffe geschehen. Ist die Packung nicht homogen und dicht, so kippen, besonders bei starker Beladung, die Zonen weg und machen die Trennwirkung zunichte. Frisches Säulenmaterial

¹⁶ H. A. Nathan und H. B. Funck, *Amer. J. Clin. Nutrition* 7, 375 (1959).

¹⁷ A. Wacker und L. Träger, *Z. Naturforschung* 17b, 369 (1962).

¹⁸ E. L. Patterson, R. Milstrey und E. L. R. Stokstad, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5868 (1956).

(P-Cellulose, Serva-Entwicklungslabor Heidelberg, Kapazität 0·8–1 m Äqu./g) wird zunächst in einem geräumigen Stutzen 5–6 mal mit Wasser aufgeschlämmt; die feine Trübung, die sich nicht rasch absetzt, wird dekantiert. Stebenlassen über Nacht wirkt sich günstig aus, da die an den Cellulosepartikeln adsorbierte Luft nur langsam entweicht. Zum Einschlänmen wird die Säule zu einem Drittel mit Wasser gefüllt und die P-Cellulose in dünnflüssiger Suspension eingegossen, bis die Säule etwa 2–3 cm hoch gefüllt ist. Man lässt dann absitzen, lässt die Säule gerade trocken laufen und presst die Füllung gut an; dann füllt man vorsichtig Wasser auf und giesst die nächste Schicht ein. Dieses schichtweise Aufstocken der Säule ist unerlässlich, da nur so eine befriedigende Packung erzielt werden kann. Ebenso wichtig für die Homogenität ist, dass das Material in der Säule regeneriert wird. P-Cellulose wird regeneriert durch aufeinanderfolgende Behandlung mit 5%iger Ameisensäure–5%iger Ammoniumformiatlösung, 5%iger Ameisensäure, und Wasser bis zur neutralen Reaktion des Eluates.

Chromatographie von Aminobiopterin bzw. Aminoneopterin. Man lässt die regenerierte Säule gerade trocken laufen, presst das Material gut an und schichtet vorsichtig ca. 2 cm Wasser auf den Säulenkopf. Dann trägt man die betreffende Lösung auf, ohne das Säulenmaterial aufzuwirbeln. Nach dem Einsickern wäscht man 2–3 mal mit Wasser nach, schichtet ca. 10 cm Wasser auf die Säule und legt ein dem Säulendurchmesser entsprechendes Rundfilter auf den Säulenkopf, um ein Durchschlagen des Elutionsmittels zu vermeiden. Die Zuführung zur Säule soll so bemessen sein, dass die Tropfhöhe nicht mehr als 3 cm beträgt. Man lässt nun ca. 500 ml Wasser durch die Säule laufen und verbindet sie dann mit dem geschlossenen Gradienten-Mischgefäß, das 500 ml Wasser enthält und mit einem Magnetrührer versehen ist. Die Tropfgeschwindigkeit soll 10 Tropfen/Min. nicht überschreiten und die Chromatographie im Dämmerlicht ausgeführt werden. Als Vorratslösung für den Gradienten werden nacheinander jeweils 500 ml folgender Ameisensäurekonzentrationen vorgelegt: 0·019n, 0·031n, 0·043n, 0·055n, 0·067n. Das Eluat wurde in 18 ml-Fractionen aufgefangen, deren UV-Extinktion bei 245 und 335 μ vermessen wird. Bei einer Extinktion über 2·5 wird mit Wasser entsprechend verdünnt. Die nach dem Quotientenverlauf zusammengegebenen Fractionen werden im Rotationsverdampfer eingeengt und dann zur Entfernung der Ameisensäure mit Äther perforiert. Einheitliche Fractionen werden stark eingeengt und nach Filtrieren durch Lyophilisieren getrocknet. Zum Umkristallisieren werden die Verbindungen bei höchstens 40° in n-Propanol gelöst, filtriert und dann im Rotationsverdampfer bis zur Sättigungskonzentration eingeengt. Die Verbindungen scheiden sich in der Kälte in hellgelben Mikrokristallen ab und werden durch Zentrifugieren von der Mutterlauge abgetrennt. Ausbeuten: Aminobiopterin 8 mg, Aminoneopterin 10 mg; zur Charakterisierung wurden ferner 8 mg Amino-7-biopterin und 7 mg Amino-7-neopterin gewonnen. Die Substanzen zersetzen sich ohne definierten Schmelzpunkt beim Erhitzen auf über 250°. R_F -Werte und papierchromatographische Systeme: (aufsteigende Trennung auf Papierstreifen Schleicher & Schüll, 2043 b)

| | Aminobiopterin | Aminoneopterin |
|---|----------------|----------------|
| n-Butanol/Eisessig/Wasser (20:3:7) | 0·28 | 0·16 |
| 3%ige wässr. Ammonchloridlösung | 0·63 | 0·56 |
| 4%ige wässr. Natriumcitratlösung | 0·36 | 0·33 |
| n-Propanol-1%iger wässr. Ammoniak (2:1) | 0·33 | 0·23 |

Permanganat-Oxydation. 1 ml der zu oxydierenden Fraction wird in einem Reagenzglas mit 2 ml 0·2n NaOH versetzt. Dann gibt man tropfenweise konz. Kaliumpermanganatlösung zu, bis keine Entfärbung mehr eintritt und erwärmt das Gemisch darauf noch 15 Min. auf dem Wasserbad. Überschüssiges Permanganat wird durch einige Tropfen Alkohol zersetzt und der ausgefallene Braunstein über eine Schicht Hyflo abfiltriert. R_F -Werte in 4%iger Natriumcitratlösung: 2,4-Diaminopteridincarbon säure-6: 0·16, 2,4-Diaminopteridincarbon säure-7: 0·24.

NMR-Spektren. Aminobiopterin und Aminoneopterin wurden in einem VARIAN A-60 Spektrometer bei 33° in Hexadeutero-Dimethylsulfoxyd (99% D) gemessen mit Tetramethylsilan als innerem Standard. Die Konzentration betrug jeweils 8%.

Crithidia-Wachstumstest. Der Test wurde nach der bereits beschriebenen Methode¹⁸ durchgeführt. Als Nährlösung diente das von Guttman¹⁹ angegebene Medium.

Herrn Professor A. Butenandt sind wir für die grosszügige Förderung dieser Untersuchung zu Dank verpflichtet. Frau I. Bürger danken wir für die Aufnahme der UV-, Fräulein G. Schild für die Aufnahme der NMR-Spektren. Herrn Dr. J. Sonnenbichler haben wir für die Diskussion der NMR-Spektren zu danken.

¹⁸ G. Hanser und H. Rembold, *Z. Physiol. Chem.* 319, 200 (1960).

¹⁹ H. N. Guttman, *Pteridine Chemistry* S. 255, Pergamon Press, Oxford (1964).