

Immobilisierung von Cytidin und Uridin über 2',3'-O-cyclische Acetalderivate an Agarose

Immobilisation of Cytidine and Uridine via 2',3'-O-Cyclic Acetal Derivatives to Agarose

Frank Seela und Helmut Rosemeyer

Laboratorium für Bioorganische Chemie im Fachbereich 13 der Universität Paderborn, Gesamthochschule und
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

Z. Naturforsch. **33 c**, 56–60 (1978) ; eingegangen am 7. November 1977

Agarose Linked Ribonucleosides, Absolute Configuration and Assignment of NMR Signals of Cytidine and Uridine-2',3'-O-acetal Derivatives, Affinity Resins for Nucleoside Converting Enzymes

Condensation of cytidine or uridine with ethyl levulinate leads to the acetals **1a/2a**. The reaction would be expected to give mixtures of diastereoisomers. As shown by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy only one diastereoisomer is formed. By spectroscopic comparison of **1a/2a** with the corresponding adenosine acetal the absolute configuration of the new chiral centre was found to be R. The acetal methyl group of **1a/2a** in exo-location can serve to distinguish the two methyl signals of O-2',3'-isopropylidencytidine and -uridine in the NMR spectra. On alkaline hydrolysis of the esters the acids **1b** and **2b** are formed, which can be condensed through their carboxyl groups with 6-aminohexylagarose. The affinity resins **3** and **4** contain 7.1 μmol and 7.6 μmol ligand/g moist gel respectively. A biospecificity of the new polymers to cytidine- and uridine converting enzymes is expected.

Einleitung

Die Immobilisierung von Nucleosiden ist von generellem Interesse, weil Polymere mit Nucleosid-Liganden sowohl als biospezifische Affinitätscharze zur Auftrennung hochmolekularer Naturstoffe, wie z. B. Enzymen, als auch zur Untersuchung von Reaktionen an polymeren Oberflächen benutzt werden können [1–3].

Die kovalente Verknüpfung eines Nucleosides mit einem polymeren Träger kann entweder an der Nucleobase oder dem Riboserest, bei Nucleotiden auch am Phosphatrest erfolgen. Während für Purin-Ribonucleoside, speziell für Adenosin, eine Reihe von Immobilisierungsmethoden, die meist die Nucleobase mit dem Polymer verknüpfen, zur Verfügung stehen [3], ist die Immobilisierung von Pyrimidin-Ribonucleosiden weit weniger untersucht.

Wir haben unlängst eine Methode zur kovalenten Verknüpfung von Ribonucleosiden über cyclische Acetalderivate mit Polymeren, zum Beispiel Agarose, entwickelt [4]. Diese Methode, die bisher nur zur Immobilisierung von Purinnucleosiden [5] benutzt wurde, wird hier erstmals zur Darstellung von Polymeren mit Pyrimidinnucleosid-Liganden, wie Cytidin und Uridin, angewandt.

Synthese und Eigenschaften spacerverlängerter Cytidin- und Uridin-Acetale

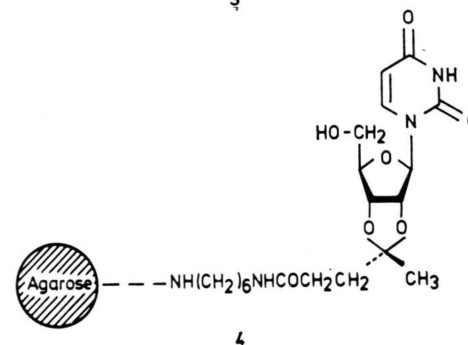
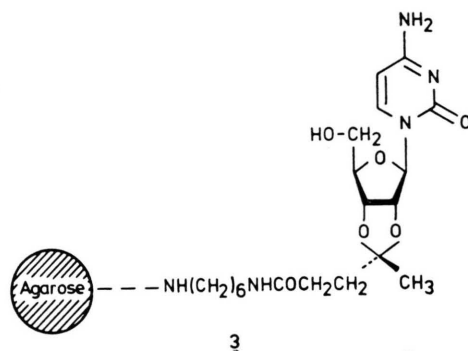
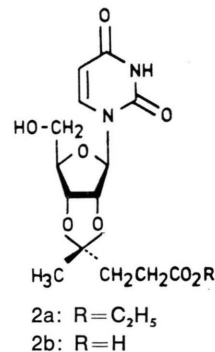
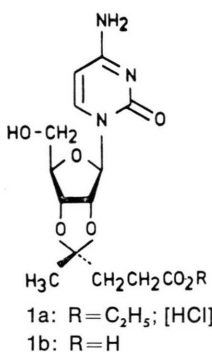
Kondensiert man Cytidin mit Lävulinsäureethyl-ester in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethyl-ester unter säurekatalysierten Bedingungen so entsteht das Cytidinacetal **1a**, das als Hydrochlorid in 84% Ausbeute kristallin isoliert werden kann [6]. Überträgt man die Reaktion auf Uridin, so läßt sich nur ein amorphes Reaktionsprodukt isolieren, das jedoch im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, 0,25 M LiCl) einheitlich wandert. Wie das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt, erfolgt auch bei Uridin die Acetalisierung ausschließlich an den 2',3'-Hydroxylgruppen, denn die ^{13}C -Signale von C-2' und C-3' sind im Vergleich zu den Stammverbindungen durch die Acetalbildung um ca. 10 ppm zu höheren Feldstärken verschoben (Tab. I). Die bei **1a** bzw. **2a** beobachteten C-2'/C-3'-Verschiebungen werden auch bei den entsprechenden Isopropylidenderivaten gefunden (Tab. I). Eine Acetalisierung über die 3',5'-Hydroxylgruppen unterbleibt.

Bei den Reaktionsprodukten **1a** bzw. **2a** sollte es sich um Diastereomeregemische handeln, denn bei der Acetalbildung wird ein neues chirales Zentrum gebildet. Die Diastereoisomeren sollten im ^1H -NMR-Spektrum für die chemisch nicht äquivalenten Acetal-methylgruppen zwei Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebung zeigen. Die ^1H -NMR-Spektren von **1a** bzw. **2a** lassen jedoch nur ein Acetalmethyl-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Frank Seela, Laboratorium für Bioorganische Chemie im Fachbereich 13, Universität Paderborn – Gesamthochschule, Warburger Str. 100, D-4790 Paderborn.

Tab. I. ^{13}C -Verschiebungen * von Cytidin- und Uridin-O-2',3'-Acetalen.

	C-2	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	CH ₃ (exo)	CH ₃ bzw. CH ₂ (endo)	C- Acetal	CH ₂ CO	CO	CH ₂ O	CH ₃ - Ester
Cytidin	157,0	166,7	95,7	142,8	90,1	70,6	75,1	85,4	61,9							
1a	159,8	145,4	93,5	146,8	92,9	80,6	84,5	87,7	61,0	23,5	28,2	113,3	33,4	172,4	59,8	14,0
1b	165,8	154,7	94,1	143,1	92,9	80,7	84,2	86,7	61,5	23,6	28,3	113,6	33,8	174,0		
Isopropyliden- cytidin HCl	159,7	145,3	93,5	146,9	92,9	80,4	84,4	87,8	60,9	25,0	26,8	112,6				
Uridin	152,4	164,7	103,1	142,2	89,1	71,1	74,9	86,0	62,2							
2a	150,4	163,2	101,7	142,0	91,1	80,5	83,8	86,5	61,3	23,6	28,2	113,8	33,4	172,6	59,9	14,0
2b	150,3	163,1	101,7	142,0	91,1	80,5	83,7	86,5	61,3	23,6	28,2	113,9	32,8	174,1		
Isopropylidenuridin	150,4	163,2	101,7	141,9	91,1	80,6	83,7	86,5	61,3	25,1	27,0	112,9				

* In (ppm) relativ zu TMS; gemessen in DMSO-d₆. Spektrometer: Bruker HX-60; Mode: Fourier-Transform.

signal erkennen, was die Bildung nur eines Diastereoisomeren anzeigt.

Aus den Estern **1a** und **2a** lassen sich die Säuren **1b** und **2b** durch alkalische Hydrolyse gewinnen. Die Säuren, die nach Abfangen überschüssiger Natronlauge mit saurem Ionenaustauscher, in der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel, Natriumcitratpuffer, pH 6,5) als Anionen mit R_F -Werten von jeweils (+) 3,0 relativ zu den Stammnucleosiden einheitlich wandern, sind nur schwierig von anorganischen Salzen zu befreien. Ihre große Wasserlöslichkeit verhindert auch eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Abhilfe brachte die Chromatogra-

phie an Dowex 1×2 -Anionenaustauscher in der Acetatform. Nach Adsorption der Säuren **1b/2b** ließen sich diese mit Wasser/0,5 M Essigsäure (linearer Gradient) eluieren und aus den Eluaten durch einfaches Abdampfen analysenrein erhalten.

Unklar war die Stellung der Acetalreste relativ zur Ribose und damit die absolute Konfiguration am Acetalkohlenstoff. Wie bereits die Röntgenstruktur von Carboxyethylethylidenadenosin zeigt [7], fällt dort stereoselektiv das Diastereoisomer mit exo-ständiger Methylgruppe an. Da die ^1H -NMR-Signale der Acetalmethylgruppen von **1b** bzw. **2b** mit denen des Adenosinacetals zusammenfallen, sind sie auch hier exo-ständig. Damit ist die absolute Konfiguration am Acetalkohlenstoff R. Die genaue Kenntnis der chemischen Verschiebung der exo-ständigen Acetalmethylgruppen von **1a/1b** bzw. **2a/2b** gestattet nunmehr auch die Zuordnung der stereochemisch nicht äquivalenten Methylgruppen von Isopropylidencytidin und Isopropylidenuridin. Wie die Tab. I zeigt, sind die Signale der exo-ständigen Substituenten gegenüber den endoständigen Gruppen zu höheren Feldstärken verschoben.

Darstellung und Eigenschaften der Polymere **3** und **4**

Die spacerverlängerten Nucleosidliganden **1b** bzw. **2b** werden in Dioxan/Wasser in Gegenwart von wasserlöslichem Carbodiimid mit 6-Aminoethylagarose kondensiert. Niedermolekulares Material kann durch Waschen mit Wasser von den Polymeren **3** bzw. **4** abgetrennt werden. Man erhält farblose Gele, die im feuchten Zustand aufbewahrt werden. Um auszuschließen, daß zwischen **4** und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid im Gegensatz zu N-Cyclohexyl-N'- β -(4-methylmorpholinium)-ethylcarbodiimid-*p*-toluolsulfonat [8] unter den angegebenen Bedingungen eine Reaktion an N(3) eintritt, wurde **2b** in Gegenwart des Kondensationsmittels 24 h bei pH-Werten zwischen 4–10 geschüttelt. Unverändertes **2b** konnte in allen Fällen dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Ligandenkonzentration werden die Polymere bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Hydrolysieren mit halbkonzentrierter Salzsäure erhält man klare Lösungen, deren Extinktionen bestimmt werden. Gleiche Substanzmengen hydrolysierter 6-Aminoethylagarose führen zum Blindwert der Extinktion. Nach Abzug des Blindwertes von den Extinktionen der Agarosederivate **3**

und **4** und Vergleich mit den Extinktionen bestimmter Mengen hydrolysiertem, spacerverlängerten Liganden **3** bzw. **4** erhält man für das Gel **3** 166 μmol Ligand/g trockenes Polymer **3** und 189 μmol Ligand/g **4**. Bezogen auf die feuchten Gele mit Wassergehalten von 96% ergeben sich für **3** 7,1 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes Gel **3** und 7,6 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes Gel **4**.

Die Agarosederivate **3** bzw. **4** sollten eine hohe biospezifische Affinität gegenüber nucleosidumwandelnden Enzymen besitzen. Das gilt speziell für solche, deren Wechselwirkung mit Cytidin bzw. Uridin basenspezifisch erfolgt und deren Bindung durch die Immobilisierung des Nucleosids über die 2'.3'-Hydroxylgruppen nicht ungünstig beeinflusst wird. Damit bietet sich das Agarosederivat **3** zur einfachen Isolierung von Cytidin-desaminase und das 5'-Phosphat des Agarosederivates **4** zur Isolierung und Aufreinigung von Orotidin-5'-phosphat-decarboxylase (Produktgel) an.

Experimentelles

Die Schmelzpunkte wurden mit einem SMP 20 Schmelzpunktapparat (Fa. Büchi, Schweiz) bestimmt und sind nicht korrigiert. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker HX-60 oder WP-270 Spektrometer aufgenommen; δ -Werte in ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard, UV-Spektren: Zeiss PMQ 3- oder Shimadzu UV-200 Spektrometer. Die Mikroanalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen, durchgeführt.

Chromatographie

Ionenaustauschchromatographie wurde an Dowex 1×2 Ionenaustauscher (Acetatform) durchgeführt, wobei ein UltroRac Fraktionssammler mit der optischen Einheit Uvicord II (Fa. LKB Instruments, Schweden) verwendet wurde. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel F 254 Platten (Fa. Woelm, Eschwege) benutzt.

6-Aminoethylagarose (AH-Sepharose 4B) wurde von der Fa. Pharmacia, Fine Chemical AB (Uppsala, Schweden) bezogen. Das trockene Polymer wurde in 0,5 M wäßrigem Natriumchlorid aufgeschlämmt, mit der gleichen Lösung und danach mit Wasser gewaschen und soweit abgesaugt, bis die Oberfläche des Gels brach.

2'.3'-O-(Carboethoxyethyl)-ethylidencytidin wurde nach Seela und Cramer [6] dargestellt.

2'.3'-O-(2-Carboxyethyl)-ethylidencytidin (1b)

1,0 g (2,46 mmol) **1a** werden in 60 ml Ethanol/1 N Natronlauge (1 : 1) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch Zusatz von Ionenaustauscher Amberlite (H⁺-Form) wird an der Glaselektrode neutralisiert. Nach Abfiltrieren und Waschen des Ionenaustauschers mit Ethanol/Wasser (1 : 1) wird zur Trockene abgedampft. Der Rückstand wird in 30 ml Wasser aufgenommen und mit verdünntem Ammoniak auf pH 10 eingestellt. Die Lösung wird auf eine 20 × 1,5 cm Dowex 1 × 2 Ionenaustauschersäule (Acetat-Form) aufgetragen. Elution mit 500 ml Wasser/500 ml 0,5 M Essigsäure (linearer Gradient) ergibt eine Hauptzone, aus der nach Abdampfen 600 mg (71,4%) glasiges **1b** erhalten werden.

DC (0,5 M LiCl): $R_F = 0,50$; UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 235, 269 nm ($\epsilon = 7200, 7500$).

¹H-NMR (DMSO-d₆): 1,27 (s, CH₃-exo), um 2,0 (m, CH₂-endo), um 2,3 (m, CH₂CO), um 3,6 (m, H-5'), um 4,0 (m, H-4'), um 4,9 (m, H-2' und H-3'), 5,57 (d, H-1', $J = 2,5$ Hz), 5,70 (d, H-5, $J = 7,0$ Hz), 7,28 (NH₂, breit), 7,70 ppm (d, H-6, $J = 7,0$ Hz).

C₁₄H₁₉N₃O₇ (341,33):

Ber.	C 49,26	H 5,61	N 12,31
Gef.	C 49,05	H 5,50	N 12,25

2'.3'-O-(Carboethoxyethyl)-ethylidenuridin (2a)

4,88 g (20 mmol) Uridin werden in 75 ml trockenem DMF suspendiert und mit 5,7 g (40 mmol) Lävulinsäureäthylester, 5 ml Orthoameisensäuretriäthylester und 10 ml 7 M HCl in Dioxan versetzt. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt und dann in 500 ml trockenen Ether gegossen. Das sich abscheidende Öl wird mit 200 ml Ether gewaschen, in Chlorform unter Zugabe von 2-prozentiger NaHCO₃-Lösung gelöst, die organische Phase mit Wasser gewaschen und zur Trockene eingedampft. Nachdampfen mit Aceton führt zu 5,92 g (80%) glasigem, gelblichen **2a**.

DC (0,25 M LiCl): $R_F = 0,41$; UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 261 ($\epsilon = 9600$).

¹H-NMR (DMSO-d₆): 1,20 (t, CH₃-Ester, $J = 7,0$ Hz), 1,28 (s, CH₃-exo), um 2,0 (m, CH₂-endo), um 2,2 (m, CH₂O), 3,55 (d, H-5'), 4,07 (q, CH₂-Ester, $J = 7$ Hz), um 4,1 (m, H-4'), um 4,8 (m, H-2' u. H-3'), 5,38 (d, H-5, $J = 7$ Hz), 5,72 (d, H-1', $J = 2,5$ Hz), 7,45 ppm (d, H-6, $J = 7$ Hz).

C₁₆H₂₂N₂O₈ (370,37):

Ber.	C 51,89	H 5,99	N 7,56
Gef.	C 51,99	H 6,16	N 7,54

2'.3'-O-(Carboxyethyl)ethylidenuridin (2b)

1,0 g (2,7 mmol) **2a** werden wie **1a** hydrolysiert und aufgearbeitet. 591 mg (64,0%) farbloses glasiges **2b**.

DC (0,25 M LiCl): $R_F = 0,62$; UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 261 nm (ϵ 8700).

¹H-NMR (DMSO-d₆): 1,25 (s, CH₃-exo), um 2,0 (m, CH₂-endo), um 2,2 (m, CH₂CO), 3,55 (m, H-5'), 4,10 (m, H-4'), um 4,8 (m, H-2' und H-3'), 5,43 (d, H-5, $J = 7,0$ Hz), 5,65 (d, H-1, $J = 2,5$ Hz), 7,77 ppm (d, H-6, $J = 7,0$ Hz).

C₁₄H₁₈N₂O₈ (342,31):

Ber.	C 49,12	H 5,30	N 8,18
Gef.	C 49,23	H 5,48	N 8,22

Kondensation von 1b mit 6-Aminohexylagarose zu 3

50 mg (147 μ mol) **1b** werden in 10 ml Wasser gelöst und mit 5,0 g feuchter 6-Aminohexylagarose und 100 mg EDC * versetzt. Man schüttelt über Nacht, filtriert und wäscht mit 0,5 M NaCl-Lösung sowie mit Wasser. 5,0 g farbloses Agarose-Derivat **3**. Ligandenkonzentration: je 500 mg des feuchten Gels und feuchter 6-Aminohexylagarose werden 72 h bei 95 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. 8,4 mg trockene 6-Aminohexylagarose, 8,4 mg Agarose-Derivat **3** und 965 μ g (2,83 μ mol) **1b** werden in je 5 ml 1 N HCl bei 100 °C hydrolysiert. Die drei Proben werden mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und in 1 cm Quarzküvetten bei 269 nm vermessen. 6-Aminohexylagarose: $E_{269} = 0,505$; Agarose-Derivat **3**: $E_{269} = 0,625$; Acetal **1b**: $E_{269} = 0,245$. Extinktion des Liganden 0,625 – 0,505 = 0,120 = 1,39 μ mol/8,4 mg = 166 μ mol Li-gand/g trockenes Polymer **3**.

Kondensation von 2b mit 6-Aminohexylagarose zu 4

51 mg (150 μ mol) **2b** werden in 10 ml Wasser gelöst, mit 5,0 g 6-Aminohexylagarosegel und 100 mg EDC versetzt. Die Suspension wird wie bei **3** behandelt und aufgearbeitet. 5,0 g feuchtes Agarose-

* N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid.

Derivat **4**. Ligandenkonzentration: Das Agarosegel **4**, 6-Aminohexylagarose und **2b** werden wie bei **3** behandelt und nach der Hydrolyse auf 50 ml aufgefüllt. 6-Aminohexylagarose: $E_{261} = 0,463$; Aga-

resederivat **4**: $E_{261} = 0,578$; 3,495 mg ($10,2 \mu\text{mol}$) Acetal **2b**: $E_{261} = 0,746$. Ligandenextinktion: $0,578 - 0,463 = 0,115 = 1,57 \mu\text{mol}$; Ligand/8,4 mg = $189 \mu\text{mol/g}$ trockenes Polymer **4**.

- [1] C. R. Lowe u. P. D. G. Dean, Affinity Chromatography, Wiley, London 1975.
- [2] R. Berger, Z. Chem. **16**, 386–395 (1976).
- [3] W. B. Jakoby u. M. Wilchek, Methods Enzymol. **34**, 475–491 (1974).
- [4] F. Seela u. S. Waldeck, Nucleic Acids Res. **2**, 2343–2354 (1975).
- [5] H. Rosemeyer u. F. Seela, Carbohydrate Res., in press.
- [6] F. Seela u. F. Cramer, Chem. Ber. **108**, 1329–1338 (1975).
- [7] D. Adamiak, M. Noltemeyer, W. Saenger u. F. Seela, in Vorbereitung.
- [8] D. H. Metz u. G. L. Brown, Biochemistry **8**, 2312–2328 (1969).