

272. Über Pterinchemie

76. Mitteilung [1]

Eine einfache Synthese von Leucovorin¹⁾

von Esam Khalifa, Abhoy N. Ganguly, Jost H. Bieri und Max Viscontini

Organisch-chemisches Institut der Universität, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich.

(25.IX.80)

A Convenient Synthesis of Leucovorin

Summary

The synthesis of leucovorin, a 5-formyl-(6 *R* or *S*)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutamic acid (II) is described. The L-folic acid was first reduced to (6 *R*, *S*)-tetrahydro-L-folic acid (I); formylation with methyl-formate in DMSO gave directly leucovorin (as a diastereomeric mixture) in good yields. To demonstrate, that the formylation occurred regiospecifically at N(5) and not at N(10), *N*(10)-nitroso-(6 *R*, *S*)-tetrahydro-L-folic acid was formylated under the same conditions. Reductive elimination of the *N*(10)-nitrosogroup gave the identical leucovorin as in the previous case. The synthetic leucovorin was biologically as active as the natural product with *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 and *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081.

Leucovorin (II), auch Folinsäure oder *Citrovorum*-Faktor genannt, wurde aus Leber isoliert und als Wachstumsfaktor für *Leuconostoc citrovorum* erkannt [2]. Verschiedene Synthesen dieser biologisch wichtigen Substanz wurden publiziert, da Leucovorin (II) eine zentrale Rolle bei der Übertragung von C₁-Einheiten in zahlreichen Biosynthesen spielt. Leucovorin wurde entweder durch Formylierung von L-Folsäure an N(10), Reduktion zum Tetrahydro-Derivat (2 Std., unter Druck bei 120°) [3], oder durch katalytische Hydrierung von Folsäure in Ameisensäure, Zugabe von NaOH zur Lösung bis auf pH 13 und 1std. Kochen [4] [5], erhalten.

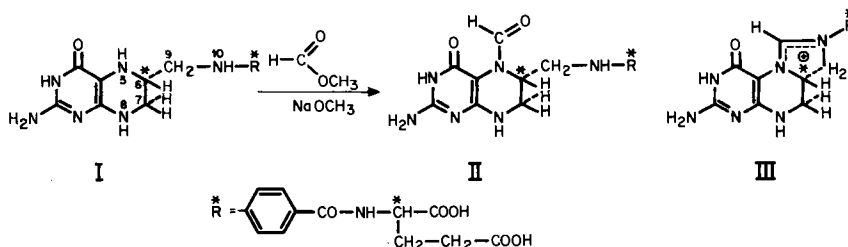
Die publizierten Synthesen sind aufwendig, ergeben schlechte Ausbeuten und liefern unerwünschte Nebenprodukte, wie z.B. das Kation der 5,10-Metheno-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (III), deren Abtrennung nicht einfach ist.

In [5] erwähnen die Autoren, dass bei der Behandlung von 500 mg Tetrahydrofolsäure (I) mit Ameisensäuremethylester und Na-Methylat (2 Std., unter

¹⁾ Teil der Dissertation von E. Khalifa, Universität Zürich 1980.

Druck, 150°, Inertgas (N₂)) unter anderem eine Substanz biologisch nachgewiesen wurde, deren Test mit *L. citrovorum* eine gesamte Aktivität von 9,5 mg Leucovorin zeigte. Die Autoren versuchten jedoch nicht, diese Substanz zu isolieren. Dieser Hinweis liess vermuten, dass eine direkte Formylierung von der heute leicht zugänglichen (6*R*, 5*S*)-6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (I) [6] [7] mit Ameisensäuremethylester für die Gewinnung von II sehr geeignet sein könnte, da der p*K*_b-Wert von N(5) bedeutend kleiner als jener von N(10) ist [8] und dementsprechend eine Reaktion dieses N-Atoms mit dem Ester als eher wahrscheinlich erscheint.

Schema 1



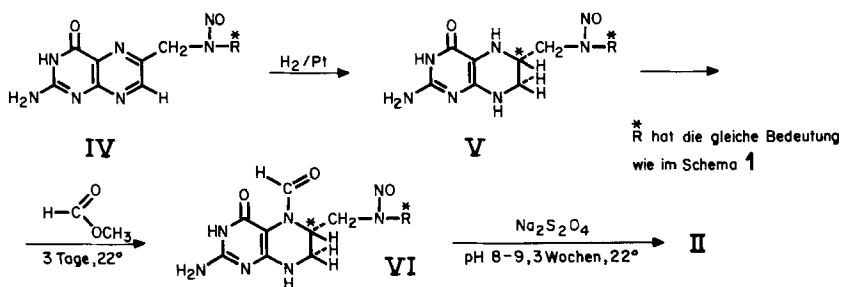
Die Reaktion von I mit Ameisensäuremethylester in Dimethylsulfoxid (72 Std.) führte zum Ziel. Eine einfache Chromatographie auf Cellulose mit Wasser als Eluierungsmittel genügte, um das Leucovorin vom begleitenden III abzutrennen. Die Ausbeute von II als Ca-Salz betrug ca. 60%.

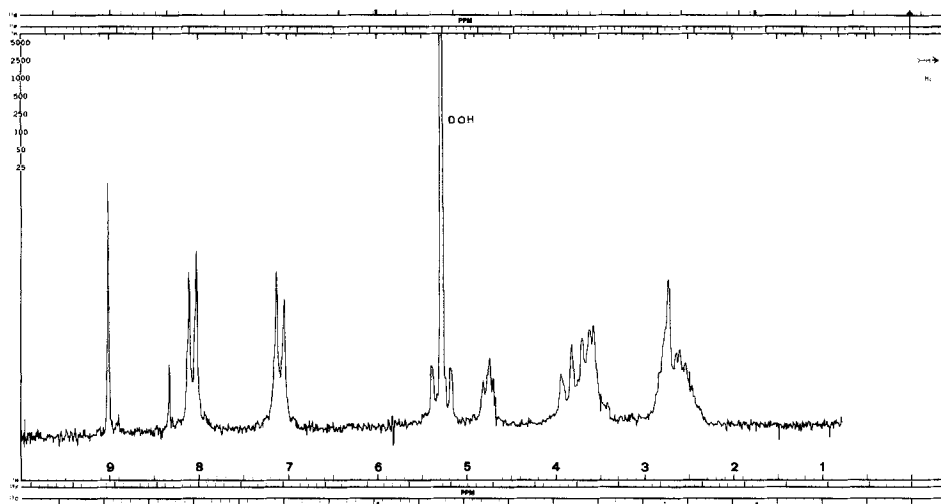
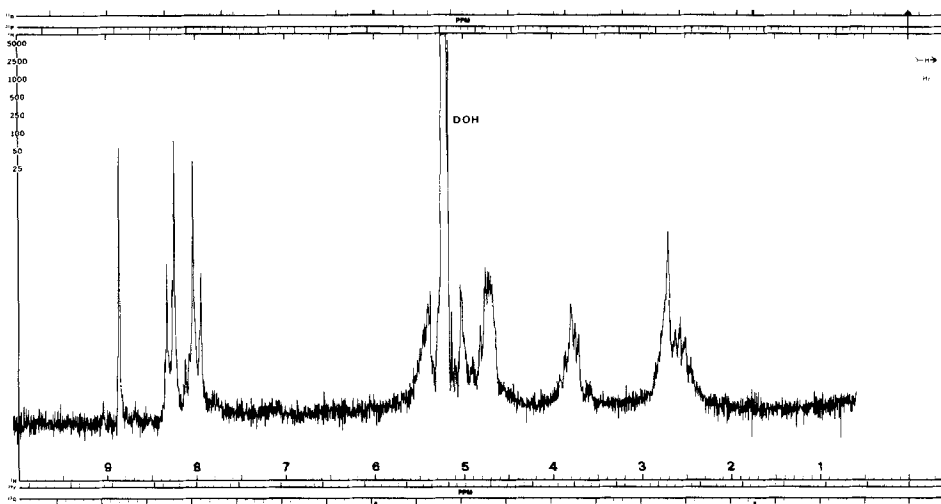
Das erhaltene Leucovorin besteht prinzipiell aus einer Mischung von zwei Diastereomeren, welche jedoch weder chemisch noch spektroskopisch differenziert werden konnten; wir geben dabei in der vorliegenden Mitteilung die Formeln I, II, III willkürlich mit der (6*R*)- und die Formeln V, VI mit der (6*S*)-Chiralität wieder.

Das ¹H-NMR.-Spektrum des so synthetisierten Leucovorins zeigt in 0,1*N* DCl/D₂O und in 1*N* NaOD/D₂O das Vorhandensein von zwei Rotameren. In 1*N* NaOD (Fig. 1) zeigt das H-CO-N(5) zwei Singulette bei 9,02 und 8,32 ppm. Beide sind stabil in D₂O bzw. 0,5*N* NaOD, verschwinden aber langsam durch

Hydrolyse in 1,84*N* NaOD (*t*_{1/2} = 48 Std.) und werden durch das H-C(=O)-O-Signal bei 8,8 ppm ersetzt. In DMSO erscheint jedoch nur noch ein Rotamer, ein Ergebnis,

Schema 2



Fig. 1. ^1H -NMR.-Spektrum von Leucovorin (II) in 0,1N NaODFig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum von *N*(10)-Nitroso-leucovorin (VI) in 0,1N NaOD

das sich mit der schon für andere *N*(5)-Acyl-tetrahydropterine gemachten Beobachtung deckt [9].

Als Strukturbeweis der Formylierung am *N*(5) haben wir die analoge Reaktion mit der am *N*(10)-Atom geschützten *N*(10)-Nitroso-L-folsäure (IV) [10] [11] ausgeführt. Im Gegensatz zur L-Folsäure gelang die katalytische Reduktion von IV zu V ohne Hydrogenolyse [6]. Anschliessend wurde V formyliert, das *N*(10)-Nitroso-leucovorin (VI) isoliert, gereinigt und charakterisiert. Ausser der Mikroanalyse zeigte das ^1H -NMR.-Spektrum der Substanz (Fig. 2), dass die *N*(10)-Nitroso-Gruppe immer vorhanden war. Diese Gruppe bewirkt, dass die zum *N*(10)

ortho- und *meta*-ständigen aromatischen Protonen in II und VI unterschiedliche $AA'BB'$ -Systeme ergeben: $\delta_A = 8,2$ und $\delta_B = 8,0$ in VI, dagegen $\delta_A = 8,05$ und $\delta_B = 7,10$ im ungeschützten Leucovorin (II) (Fig. 1).

Die reduktive Entfernung der Nitrosogruppe verlief bei VI langsamer als bei IV [11], gelang jedoch, wenn man VI 3 Wochen lang mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ behandelte (pH 8–9, 22°). Unter diesen Bedingungen wurde die Formylgruppe nur teilweise hydrolytisch abgespalten, während die *N*(10)-Nitroso-Gruppe vollständig eliminiert wurde. Das als Ca-Salz gereinigte Leucovorin erwies sich als identisch mit dem auf direktem Weg erhaltenen Produkt.

Biologische Teste. Das Ca-Salz des Leucovorins (II) war ebenso aktiv wie (6*R*, *S*)-Tetrahydro-L-folsäure mit *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 in «Folic Acid Assay Medium (Difco)» und als *Citrovorum*-Faktor (folinic acid, K+K Laboratories) mit *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081 in «CF-Assay-Medium (Difco)».

Wir danken den Herren Dr. W. Schwotzer und E. Vonbank (Abteilung Prof. Dr. W. v. Philipsborn) sowie Dipl.-chem. A. Gut für die Aufnahme zahlreicher ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren, Herrn H. Frohofer, Leiter der Mikroanalytischen Abteilung, für die Elementaranalysen, Frau Dr. E. Böhni sowie den Herren Dres. I. Kompis und R. Then (Hoffmann-La Roche & Cie., Basel) für die biologischen Teste des Leucovorins und dem Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung (A.N.G.) dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. **Allgemeines.** – Siehe [7] [11]. Die ^1H -NMR.-Spektren wurden auf einem Varian XL-100 A bzw. EM-390, 90 MHz, NMR.-Spektrographen aufgenommen. Für die Arbeit unter N_2 siehe [12].

2. **7,8-Dihydrofolsäure.** Nach der von uns modifizierten Methode [13] [6]. In einem Handschuhkasten (N_2) wurden 4 g L-Ascorbinsäure und 6 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 100 ml Wasser gelöst und das pH der Lösung mit 2*N* NaOH auf 4,5 gebracht. Anschliessend wurde eine Lösung von 2 g (4,53 mmol) Folsäure in 10 ml 1*N* NaOH tropfenweise zugegeben. Das pH der Lösung wurde wiederum auf 4,5 mit Ascorbinsäure eingestellt, worauf die 7,8-Dihydrofolsäure auszufallen begann. Die Suspension wurde 15 Min. gerührt, auf 10° gekühlt und mit 1*N* HCl auf pH 3,0 gebracht. Die ausgefallene Dihydrofolsäure wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet (50°, 6 Std./0,01 Torr): 1,65 g (82%).

3. **(6*R*, *S*)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (I).** Modifiziert nach der von uns entwickelten Methode [6] [7]: Die zunächst erhaltene Dihydrofolsäure (1,65 g, 3,72 mmol) wurde in 30 ml sauerstofffreiem Wasser aufgeschlämmt (Handschuhkasten, N_2), mit 350 mg (9,25 mmol) NaBH_4 versetzt, wobei Lösung eintrat. Nach 6 Std. Stehenlassen (22°) wurden weitere 100 mg (2,64 mmol) NaBH_4 zugegeben und die Lösung 12 Std. stehengelassen (22°). Anschliessend wurde mit Tierkohle versetzt, 30 Min. gerührt, filtriert und das pH mit 1*N* HCl vorsichtig auf 3,4 gebracht. Die ausgefallene Tetrahydrofolsäure wurde abzentrifugiert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet (40°, 6 Std./0,01 Torr): 1,3 g (75%) I.

4. **5-Formyl-(6*R*, *S*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (Leucovorin II).** Im Handschuhkasten (N_2) wurden 1,2 g (2,6 mmol) I in 10 ml DMSO/Pyridin 5:1 gelöst, dann mit 14 ml Ameisensäuremethylester versetzt und 24 Std. (Lichtausschluss, 22°) stehengelassen. Es wurden noch zweimal mit 24 Std. Abstand je 6 ml Ameisensäuremethylester und nach zusätzlichen 24 Std. 100 ml Äthanol hinzugegeben, anschliessend die Lösung mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Das Leucovorin fiel nach Zugabe von 500 ml Äther aus, wurde abzentrifugiert, mit Chloroform, Äther gewaschen und getrocknet (6 Std., 40°/0,01 Torr): 1,07 g (84%) Rohprodukt II, welches chromatographisch gereinigt wurde.

Das Rohprodukt (200 mg) wurde in der kleinsten Menge 0,1*N* NaOH gelöst, die Lösung auf eine Cellulose-Säule (30×3,5 cm) getragen und die Substanz mit Wasser eluiert. Die II enthaltenden Fraktionen (DC.-Kontrolle) wurden i.V. auf ca. 5 ml eingengt. Dazu wurden 100 mg CaCl_2 gegeben, die klare Lösung mit 50 ml abs. Äthanol versetzt, wobei das farblose Ca-Salz von Leucovorin ausfiel, welches abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und getrocknet wurde (6 Std., 50°/0,01 Torr). – DC. (Cellulose), R_f 0,71 (H_2O , 3,0% NH_4Cl , 0,5% 2-Mercaptoäthanol). – ^1H -NMR. (0,1*N* NaOD)

(Fig. 1): 9,02 und 8,32 (2s, H-CO-N(5) von zwei Rotameren [9]); 8,05 und 7,10 (2d, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J=8$ Hz, 4 arom. H); 4,75 (br. t, H-C(a)); 4,0-3,5 (m, H-C(6), 2 H-C(7), 2 H-C(9)); 2,9-2,3 (m, 2 H-C(β), 2 H-C(γ)).

$C_{20}H_{21}CaN_7O_7 \cdot 5 H_2O$ (601,56) Ber. C 39,93 H 5,15 N 16,29% Gef. C 40,08 H 4,89 N 16,28%

5. 10-Nitroso-L-folsäure (IV). Nach [10] hergestellt. – 1H -NMR. (1N NaOD): 7,66 (s, H-C(7)); 7,32 und 7,08 (2d, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J=8$ Hz, 4 arom. H); 4,75 (s, 2 H-C(9)); 3,82 (t, H-C(a)); 2,00-1,40 (m, 2 H-C(β), 2 H-C(γ)). Das Singulett bei 4,75 ppm verschwindet in ca. 120 Std. (22°) durch H/D-Austausch.

6. 10-Nitroso-(6R, S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (V). Eine Suspension von 1 g (2,1 mmol) IV in 640 ml Äthanol/Wasser 1:1 wurde mit 200 mg PtO_2 katalytisch hydriert (22°/740 Torr). Nach 5 Std. war die Reduktion beendet. Der Katalysator wurde abfiltriert und die hellgrüne Lösung, eingedampft: 900 mg (89%) rohes V, das für die Formylierung direkt gebraucht wurde. – 1H -NMR.-Spektrum (0,6N NaOD): 7,35 und 7,04 (2d, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J=8$ Hz, 4 arom. H); 4,00-3,50 (m, H-C(a) und 2 H-C(9)); 3,20-2,50 (m, H-C(6) und 2 H-C(7)); 2,00-1,50 (m, 2 H-C(β) und 2 H-C(γ)).

7. 5-Formyl-10-nitroso-(6R, S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (10-Nitroso-leucovorin, VI). Die Formylierung von 1 g (2,1 mmol) V wurde analog zu Kap. 4, aber ohne Zusatz von Pyridin, in DMSO ausgeführt. Nach Zugabe von 60 ml Äthanol wurde die Lösung filtriert und mit 300 ml Äther versetzt. Rohes VI fiel aus, wurde abzentrifugiert, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet (10 Std., 45°/0,01 Torr): 750 mg (66%) VI. Zur Reinigung wurden 200 mg wie im Kap. 4 mit Wasser auf einer Cellulose-Säule chromatographiert. Die VI enthaltenden Fraktionen wurden eingengt. Das bei 0° ausgefallene VI wurde abzentrifugiert, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet (12 Std., 22°/0,01 Torr). – 1H -NMR.-Spektrum (0,1N NaOD, 0,25N $CaCl_2$) (Fig. 2): 8,85 und 8,13 (2s, H-CO-N(5) von zwei Rotameren [9]); 8,25 und 8,0 (2d, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J=8$ Hz, 4 arom. H); 4,8-4,6 (m, H-C(a) und 2 H-C(9)); 4,0-3,65 (m, H-C(6) und 2 H-C(7)); 2,90-2,30 (m, 2 H-C(β) und 2 H-C(γ)).

$C_{22}H_{22}N_8O_8 \cdot 2 H_2O$ (538,48) Ber. C 44,57 H 4,82 N 20,79% Gef. C 44,48 H 5,11 N 19,31%

8. (R, S)-Leucovorin (II). Zu einer Lösung von 70 mg (0,13 mmol) VI in der minimalen Menge 0,1N NaOH wurden 70 mg (0,4 mml) $Na_2S_2O_4$ gegeben, das pH auf 8-9 eingestellt und 3 Wochen lang im Dunkeln stehengelassen (22°). Nach dem 3., 10. und 17. Tag wurden je 50 mg $Na_2S_2O_4$ zugegeben und das pH ständig bei 8-9 gehalten. Die Lösung wurde dann auf einer Cellulose-Säule (30 $\times$ 3,5 cm) mit Wasser chromatographiert. Die unter UV.-Licht dunkel erscheinende Zone wurde aufgefangen und wieder auf einer Sephadex-LH20-Säule (30 $\times$ 3,5 cm) mit Wasser chromatographiert. Die das Leucovorin enthaltenden Fraktionen (DC.-Kontrolle) wurden als Ca-Salz wie im Kap. 4 isoliert: 20 mg (26%).

Das so erhaltene Salz war mit dem nach Kap. 4 synthetisierten Leucovorin identisch.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 75. Mitteilung: K. Baumgartner & J. H. Bieri, *Helv.* 63, 1805 (1980).
- [2] H. E. Sauberlich & C. A. Baumann, *J. Biol. Chem.* 176, 165 (1948).
- [3] W. Shive, T. J. Bardos, T. J. Bond & L. L. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 2817 (1950); E. H. Flynn, T. J. Bond, T. J. Bardos & W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1979 (1951).
- [4] J. A. Brockman, B. Roth, H. P. Broquist, M. E. Hultquist, J. M. Smith, M. J. Fahrenbach, D. B. Cosulich, R. P. Parker, E. L. R. Stokstad & T. H. Jukes, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4325 (1950).
- [5] B. Roth, M. E. Hultquist, M. J. Fahrenbach, D. B. Cosulich, H. P. Broquist, J. A. Brockman, J. M. Smith, R. P. Parker, E. L. R. Stokstad & T. H. Jukes, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3247 (1952).
- [6] W. Frick, R. Weber & M. Viscontini, *Helv.* 57, 2658 (1974).
- [7] H.-J. Furrer, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2744 (1978).
- [8] R. G. Kallen & N. P. Jencks, *J. Biol. Chem.* 241, 5845 (1966).
- [9] R. Weber & M. Viscontini, *Helv.* 60, 152, 161 (1977).
- [10] D. B. Cosulich & J. M. Smith, jr., *J. Am. Chem. Soc.* 71, 3574 (1949).
- [11] E. Khaliifa, H.-J. Furrer, J. H. Bieri & M. Viscontini, *Helv.* 61, 2739 (1978).
- [12] R. Weber, W. Frick & M. Viscontini, *Helv.* 57, 1485 (1974).
- [13] S. Futtermann, *J. Biol. Chem.* 228, 1031 (1957); R. L. Blakley, *Nature* 188, 231 (1960).