

Neue cyclische Derivate von 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-di- und -triphosphat sowie -methylenbis(phosphonat)**

Michael Morr* und Victor Wray

Professor Fritz Wagner zum 65. Geburtstag gewidmet

Eine Reihe chemischer Synthesen von 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (3'-AdA) **1** ist bekannt^[1]; wir beschäftigen uns seit langem mit der Gewinnung von **1** durch Fermentation von *Helminthosporium* sp. 215^[2]. Das Adenosinderivat **1**, die Stammverbindung des Nucleosidantibiotikums Puromycin^[3], wurde von uns vielfältig modifiziert. So wurde **1** nach Phosphorylierung zum 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-monophosphat **9** und Cyclisierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder wasserlöslichem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, EDC) zum cAMP-Analogon 3'-Amido-3'-desoxyadenosin-3',5'-cyclophosphat (3'-NH-cAMP) **12** umgewandelt^[4,5], das für Inhibitionsstudien mit cAMP-abhängiger Proteinkinase verwendet wurde^[6].

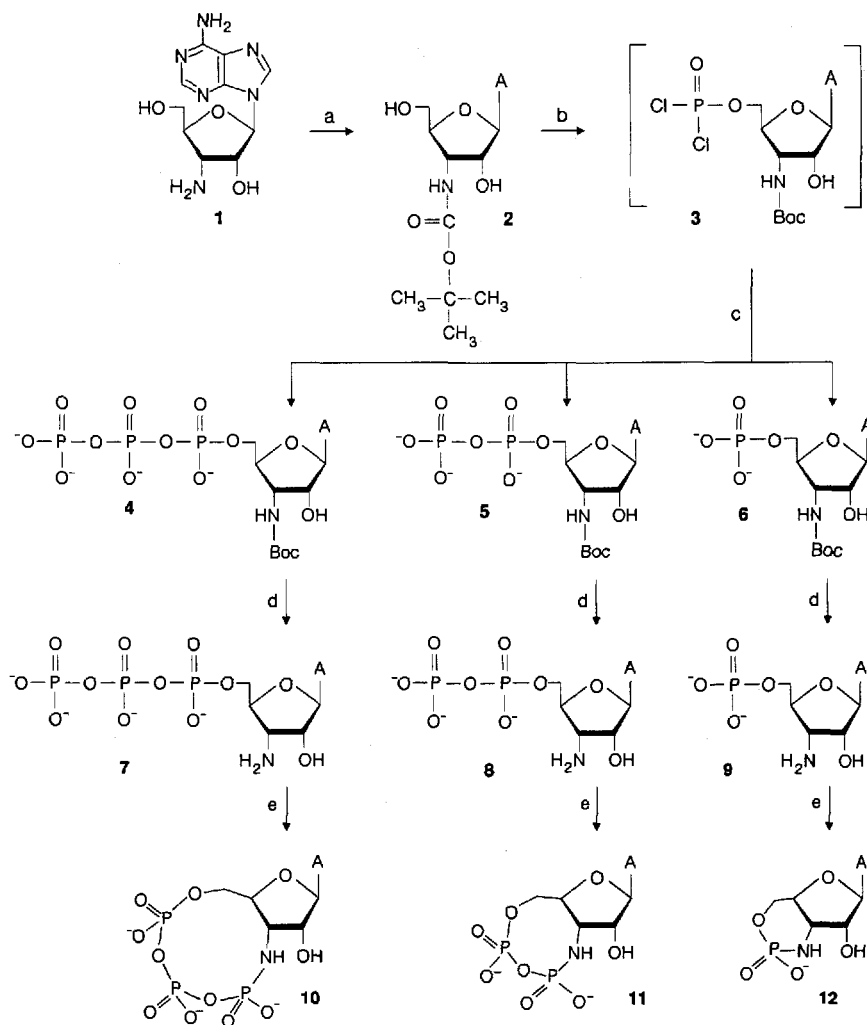
Als weiteres Derivat von **1** erwies sich das 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-triphosphat (3'-NH₂-ATP) **7** von biochemischen Interesse, das erstmals von Marutzky enzymatisch aus **9** mit Myokinase und Pyruvatkinase hergestellt wurde^[7]. **7** diente als ATP-Analogon für Substratbindungsstudien für die Leucyl-tRNA-Synthetase^[8]. Van Boom et al. synthetisierten **7** durch Phosphorylierung der 5'-OH-Gruppe nach der Triestermethode und nach Aktivierung von geschütztem **9** mit Morpholin sowie Umsetzung mit Diphosphorsäure^[9]. Neben dem Studium der Proteinbiosynthese erwies sich **7** als ein effektiver Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen^[10] und *E. coli*^[11-13].

Die Phosphorylierung von **1** nach Yoshikawa^[14] mit Phosphorylchlorid in Triethylphosphat ergibt je nach Reaktionsbedingungen unterschiedliche Produkte. So ergibt die Phosphorylierung in Suspension ausschließlich 3'-Amino-5'-chlor-3',5'-didesoxyadenosin^[15] neben wenig **9**. Löst man **1** in heißem Triethylphosphat und phosphoryliert dann mit POCl₃, so erhält man das nicht isolierte 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-phosphorodichloridat, das nach Hydrolyse im Alkalischen ausschließlich **12** liefert.

Bei einer erneuten Synthese von **12** aus nicht völlig reinem **9** – die Probe enthielt wenig 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-diphosphat **8** und das Triphosphat **7** – nach der Cyclisierungs-

methode mit EDC konnten wir nun feststellen, daß überraschenderweise auch **7** und **8** vollständig zu **10** und **11** cyclisierten.

Für die nachfolgenden Untersuchungen im größeren Maßstab wurden **7** und **8** nach Yoshikawa und Ludwig^[16] synthetisiert. Nach Einführung der *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppe in **1** mit Di-*tert*-butyldicarbonat^[17] in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) zum 3'-*N*-Boc-3'-desoxyadenosin **2**^[18] und Phosphorylierung mit POCl₃ in Triethylphosphat zum nicht isolierten Zwischenprodukt **3** wird dieses nach Ludwig mit Bis(tri-*n*-butylammonium)diphosphorsäure in guten Ausbeuten zu 3'-*N*-Boc-ATP **4** neben wenig 3'-*N*-Boc-ADP **5** und 3'-*N*-Boc-AMP **6** umgewandelt. Nach Ionenaustauschchromatographie an



Schema 1. a) (Boc)₂O, DMF, 92%; b) POCl₃, OP(OEt)₃, 90%; c) (Bu₃NH)₂H₂P₂O₇/Bu₃N/DMF, 0 °C, 5 min, 1 M (Et₃NH)HCO₃-Puffer (pH 7.5), SC: DEAE-Sephadex (HCO₃⁻), H₂O-(Et₃NH)HCO₃-Puffer-Gradient (pH 7.5), **4** 65%, **5** 20%, **6** 12%; d) TFA, 5 min, Raumtemp., SC wie b), **7** 85%, **8** 70%, **9** 92%; e) EDC, pH 7–7.5, SC wie b), **10** 88%, **11** 90%.

DEAE-Sephadex [HCO₃⁻-Form, Wasser-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7.5)-Gradient] und Abspaltung der *N*-Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) und erneuter Chromatographie erhält man **7**, **8** und **9** (Schema 1).

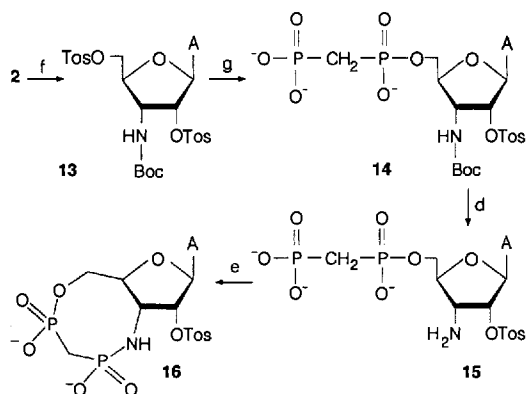
Die Cyclisierung von **7** und **8** erfolgt in sehr guten Ausbeuten mit EDC (5–10facher Überschuß, Nucleotidkonzentration 1–2 mgmL⁻¹) bei pH 7–7.5 zum 3'-Amido-3'-desoxyadenosin-3',5'-cyclodiphosphat **11** bzw. 3'-Amido-3'-desoxyadenosin-3',5'-cyclotriphosphat **10** und Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie.

[*] Dr. M. Morr, Dr. V. Wray
GBF, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig
Telefax: Int. + 531/6181-302

[**] Frau D. Döring (TU Braunschweig) danken wir für die Aufnahme der FAB-MS-Spektren.

matographie an DEAE-Sephadex (siehe oben). **11** ist das erste Derivat des natürlich vorkommenden Adenosin-3',5'-cyclophosphat (cADP)^[19], das aus der Rotalge *Porphyra perforata* isoliert und durch Cyclisierung von Adenosin-3',5'-diphosphat mit DCC synthetisiert wurde^[20, 21]. cADP inhibiert die cAMP-abhängige Proteinkinase und Phosphodiesterase vom Rind^[21] sowie in Anwesenheit von N⁶,2'-*O*-Dibutyl-3',5'-cAMP den Follikelsprung in Mausoozyten^[22]. Ein cyclisches ATP-Derivat wurde bislang in der Natur nicht gefunden, **10** wäre das erste Derivat von cATP. Geradkettige ATP- γ -Derivate mit verschiedenen Aminen wurde von Knorre et al. durch Reaktion mit DCC hergestellt^[23]. Orgel et al. untersuchten die Reaktion von AMP, ADP, ATP und ATeP (Adenosin-5'-tetrphosphat) mit wasserlöslichem Carbodiimid, ohne eine intramolekulare Cyclisierung zu beobachten^[24].

Ein weiteres interessantes Derivat von **1** wurde durch Reaktion von **2** nach Tosylierung der 3'- und 5'-Position mit *p*-Tosylchlorid in Pyridin und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zu **13** sowie selektiven nucleophilen Austausch der 5'-*O*-Tosylgruppe mit Tris(tetra-*n*-butylammonium)methylenbis(phosphonat) zu **14** erhalten^[25]. Nach Abspaltung der 3'-*N*-Boc-Schutzgruppe mit TFA und Cyclisierung von **15** mit EDC bei pH 7–7.5 und Reinigung an DEAE-Sephadex (siehe oben) erhält man in guten Ausbeuten 3'-Amido-3'-desoxy-2'-*O*-tosyladenosin-3',5'-cyclo-methylenbis(phosphonat) **16** (Schema 2).



Schema 2. cADP-Analogen mit NH und CH₂ im Ringsystem. f) TosCl, DMAP, Pyridin, 75%; g) Tris(tetra-*n*-butylammonium)methylenbisphosphonat, CH₃CN, 68%; d) siehe Schema 1, **15** 85%; e) siehe Schema 1, **16** 88%.

Die P-N-Bindungen der neuen cyclischen Derivate sind sehr hydrolysestabil. Während **12** wegen der großen Ringspannung schon bei pH 5 zu **9** gespalten wird, sind die Verbindungen **10**, **11** und **16** aufgrund der geringeren Ringspannung bei pH 3 völlig stabil. Bei pH 2 liegen die Halbwertszeiten für die Spaltung der P-N-Bindung für **10**, bei ≈ 30 h, für **11** bei ≈ 18 h und für **16** bei ≈ 4 h.

Die Strukturen von **7**, **8**, **10**, **11**, **15** und **16** wurden durch ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie (FAB-MS)^[26] bestätigt (Tabellen 1 und 2). Die Zuordnungen erfolgten durch Vergleich mit den detaillierten Literaturdaten von **9** und dessen 3',5'-Cyclophosphat **12**^[5].

Für **8**, **11**, **15** und **16** wurden zwei, für **7** und **10** drei ³¹P-NMR-Signale beobachtet. Die Ringbildung in **10**, **11** und **16** wurde bestätigt durch die Beobachtung von ³¹P-Kopplungen mit H-3' sowie mit C-2', C-3', C-4' und C-5'. Mit COSY-Experimenten und ¹³C,¹H-Korrelation (¹H-detektierte Multiquanten-

Tabelle 1. ¹H-NMR-Daten von **7**, **8**, **10**, **11**, **15** und **16** in D₂O.

Verb.	Chemische Verschiebungen [a]						
	H-2/H-8	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'A	H-5'B
7	8.41/8.15 s s	6.14 d	4.89 dd	4.31 dd	4.60 ddd	4.49 ddd	4.34 ddd
8	8.52/8.22 s s	6.12 d	4.75 dd	4.61 dd	4.37 m	4.26 ddd	4.19 ddd
10	8.45/8.20 s s	6.14 s	4.41 d	4.18 ddd	4.22 bd	4.56 bdd	4.35 bdd
11	8.28/8.22 s s	6.09 s	4.54 d	4.02 ddd	4.22 m	4.39 m	4.22 m
15 [c]	8.34/8.16 s s	6.11 d	5.54 dd	4.13 dd	4.37 m	4.29 m	4.29 m
16 [c]	8.26/8.19 s s	5.82 d	5.43 dd	4.42 ddd	4.20 ddd	4.37 ddd	4.28 ddd
	Kopplungskonstanten [Hz]						
	1'-2'	2'-3'	3'-4'	4'-5'A	4'-5'B	5'A-5'B	P-5'A
7	3.1	6.0	7.5	~2.3	~2.3	12.0	7.0
8	5.3	5.2	4.2	3	3	11.5	6
10	<2	3.2	~10	klein	klein	12.0	11
11	<2	5.1	9.0	[b]	[b]	[b]	[b]
15 [c]	6.3	7.2	5.3	[b]	[b]	[b]	[b]
16 [c]	3.9	7.5	9.8	4.1	6.3	11.7	11.8
	Kopplungskonstanten [Hz]						
	1'-2'	2'-3'	3'-4'	4'-5'A	4'-5'B	5'A-5'B	P-5'A
7	3.1	6.0	7.5	~2.3	~2.3	12.0	7.0
8	5.3	5.2	4.2	3	3	11.5	6
10	<2	3.2	~10	klein	klein	12.0	11
11	<2	5.1	9.0	[b]	[b]	[b]	[b]
15 [c]	6.3	7.2	5.3	[b]	[b]	[b]	[b]
16 [c]	3.9	7.5	9.8	4.1	6.3	11.7	11.8

[a] δ -Werte relativ zu 3-Trimethylsilyl-1-propanesulfonsäure-Natriumsalz (DSS); Signalmultiplizitäten sind unter den chemischen Verschiebungen angegeben. [b] Diese Kopplungen wurden nicht bestimmt (breite Signale, Spektrum höherer Ordnung). [c] Phosphor-gebundene Methylgruppen: **15**: $\delta = 2.27$, $J(\text{P-H})$ 19.7 Hz; **16**: $\delta = 2.32$ (P(A)), 2.24 (P(B)), $J(\text{A-B}) = 15.6$, $J(\text{A-P5})$ 20.3, $J(\text{A-P3})$ 20.3, $J(\text{A-P5})$ 18.0, $J(\text{B-P3})$ 18.9 Hz. Tosylgruppe: **15**: $\delta = 7.56$ [„d“, H-2"/6", $J(2'-3') + J(2'-5')$ 8.2], 7.07 [„d“, H-3"/5"], 2.34 [s, CH₃-4"]; **16**: $\delta = 7.67$ [„d“, H-2"/6", $J(2'-3') + J(2'-5')$ 8.2], 7.09 [„d“, H-3"/5"], 2.22 [s, CH₃-4"].

Tabelle 2. ¹³C- und ³¹P-NMR-Daten von **7**, **8**, **10**, **11**, **15** und **16** in D₂O.

Verb.	¹³ C-Verschiebungen [a]									
	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
7	155.22	151.02	121.11	157.75	142.48	91.77	76.01	53.83	83.00	67.36
8	155.22	150.80	121.00	157.68	142.25	91.75	75.86	53.85	82.56	66.71
10	155.22	150.76	121.41	158.03	142.36	91.82	77.90	54.66	83.79	65.52
11	155.22	150.54	121.02	157.80	141.83	91.82	77.61	58.97	81.61	68.32
15 [c]	155.22	150.39	120.90	157.91	142.59	87.38	83.70	54.37	86.65	66.35
16 [c]	155.22	150.24	120.27	157.89	142.15	88.01	84.07	57.03	81.91	65.71
	³¹ P-Verschiebungen [d]									
	α	β	γ	P-2'	P-3'	P-4'	P-5'	α - β	β - γ	
7	-8.98	-19.45	-4.23	—	—	9.5	5.7	19.5	20.1	
8	-9.90	-6.37	—	—	—	8.8	[c]	20.3		
10	-10.73	-22.96	-3.50	3.2	1.6	8.0, 8.0	5.2	22.4	22.4	
11	-10.78	-3.89	—	8.6	[b]	1.5	e [b]	5.9	23.8	
15	18.8 [f]	13.5	—	—	—	7.4	5.2	9.1		
16	20.9 [f]	15.3	—	5.7	3.5	3.2	4.7	9.4		

[a] δ -Werte; aus Gründen der Einheitlichkeit wurde die chemische Verschiebung von C-2 als zweiter Standard benutzt (relativ zu DSS in D₂O, pH 7.5). [b] Signalzuordnungen sind vertauschbar. [c] Zusätzliche Signale bei: **15**: $\delta = 30.40$ [P-CH₂-P, $J(\text{P-C})$ 124.8, 122.1 Hz] und von der Tosylgruppe bei $\delta = 150.39$ (s, C-1"), 132.79 (s, C-4"), 132.30, 129.63 (d \times 2, C-2"/6", C-3"/5") und 23.50 (q, C-7"); **16**: $\delta = 32.32$ [P-CH₂-P, $J(\text{P-C})$ 126.8 und 112.7 Hz] und von der Tosylgruppe bei 149.09 (s, C-1"), 132.98 (s, C-4"), 132.36, 129.87 (d \times 2, C-2"/6", C-3"/5") und 23.09 (q, C-7"). [d] Standard H₃PO₄ extern. [e] Signale verbreitert, aber keine aufgelösten(n) Kopplungen. [f] Die Tieffeldsignale gehören zu dem an C-5' der Ribose gebundenen Rest (P5 in Tabelle 1).

Kohärenz) konnten die entsprechenden Signale von **16** eindeutig zugeordnet werden. Die Verknüpfung der Methylengruppe mit zwei Phosphoratomen in **15** und **16** wurde durch die beiden großen $J(^{31}\text{P}, ^{13}\text{C})$ -Werte für das entsprechende Kohlenstoffatom angezeigt.

Inwieweit die neuen Cycloderivate mit Carriern wie 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) durch die Zellmembran transportiert werden können, soll demnächst untersucht werden.

Eingegangen am 12. Januar 1994 [Z 6604]

- [1] M. C. Samano, M. J. Robins, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2329.
- [2] N. N. Gerber, H. A. Lechevalier, *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 1731.
- [3] J. N. Porter, R. I. Hewitt, C. W. Hesselstine, G. Krupka, J. A. Lowery, W. S. Wallace, N. Bohonos, J. H. Williams, *Antibiot. Chemother.* **1952**, 2, 409.
- [4] M. Morr, M.-R. Kula, G. Roesler, B. Jastorff, *Angew. Chem.* **1974**, 86, 308; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, 13, 280.
- [5] M. Morr, M.-R. Kula, L. Ernst, *Tetrahedron* **1975**, 31, 1619.
- [6] N. Panitz, E. Rieke, M. Morr, K. G. Wagner, *Eur. J. Biochem.* **1975**, 55, 415.
- [7] R. Marutzky, Dissertation Technische Universität Braunschweig, **1975**.
- [8] R. Marutzky, J. Flossdorf, M.-R. Kula, *Nucleic Acids Res.* **1976**, 3, 2067.
- [9] G. M. Visser, C. Schattenkerk, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1984**, 103, 165.
- [10] J. T. Trauman, H. Klenow, *Mol. Pharmacol.* **1968**, 4, 77.
- [11] V. W. Armstrong, F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 79, 33.
- [12] V. W. Armstrong, F. Eckstein, *Biochemistry* **1979**, 18, 5117.
- [13] T. Kutatmadze, R. Beablashvili, A. Azharyev, A. Krayevsky, *FEBS Lett.* **1983**, 153, 420.
- [14] K. Kusashio, M. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, 41, 142.
- [15] M. Morr, M.-R. Kula, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 23.
- [16] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, 16, 131.
- [17] L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller, G. Wersin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, 357, 1651.
- [18] M. Morr, L. Ernst, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 2152.
- [19] J. C. Su, W. Z. Hassid, *Biochemistry* **1962**, 1, 474.
- [20] D. Lipkin, W. H. Cook, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 68, 136.
- [21] H. N. Wood, D. G. Lynn, *Differentiation* **1981**, 18, 51.
- [22] E. Sato, S. S. Koide, *Endocr. Res.* **1987**, 13, 399.
- [23] D. G. Knorre, V. A. Kurbatov, V. V. Samukov, *FEBS Lett.* **1976**, 70, 105.
- [24] K. E. Ng, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 3573.
- [25] V. J. Davison, D. R. Davis, V. M. Dixit, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1794.
- [26] FAB-MS (Glycerin): **10**: $C_{10}H_{15}N_6O_{11}P_3$ ber. 488 (freie Säure), gef. 487 $[M - H]^-$, 489 $[M + H]^+$; **11**: $C_{10}H_{14}N_6O_8P_2$ ber. 408 (freie Säure), gef. 407 $[M - H]^-$; **15**: $C_{18}H_{24}N_6O_{10}P_2S$ ber. 578 (freie Säure), gef. 577 $[M - H]^-$, 579 $[M + H]^+$; **16**: $C_{18}H_{22}N_6O_9P_2S$ ber. 560 (freie Säure), gef. 559 $[M - H]^-$, 581 $[M + Na-2H]^+$.

Magnetische Eigenschaften von aromatischen Übergangszuständen: die Diels-Alder-Reaktion**

Rainer Herges*, Haijun Jiao und Paul von Ragué Schleyer

Professor Werner Kutzelnigg zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Analogie zwischen den π -Elektronen in Benzol und den sechs delokalisierten Elektronen im cyclischen Übergangszustand der Diels-Alder-Reaktion zwischen Butadien und Ethylen wurde bereits 1938 von Evans et al. erkannt^[1]. Diese Interpretation wurde durch die Woodward-Hoffmann-Regeln^[2] und die Hückel-Möbius-Methode^[3, 4] auf viele pericyclische Reaktionen erweitert, und es wurde vorgeschlagen, daß thermische pericyclische

Reaktionen bevorzugt über aromatische Übergangszustände verlaufen^[5]. Obwohl die Diels-Alder-Reaktion zwischen Butadien und Ethylen als Prototyp pericyclischer Prozesse^[6] angesehen wird, ist die „energy of concert“ (Übergangszustands-Resonanzenergie) relativ klein^[7].

Wir wenden nun zum ersten Mal magnetische Eigenschaften als Kriterium^[8–10, 11b] an, um die Natur der konzertierten Übergangszustände, insbesondere bei der Diels-Alder-Reaktion von Ethylen mit Butadien und Cyclopentadien, zu untersuchen. Die magnetischen Eigenschaften von Übergangszuständen können zwar nicht gemessen werden, aber chemische Verschiebungen und magnetische Suszeptibilitäten lassen sich einfach berechnen. Die Zuverlässigkeit der IGLO^[11a]-Methode bei der Anwendung auf Grundzustände legt nahe, daß sie auch zur Analyse von Übergangszuständen geeignet ist. Darüber hinaus untersuchten wir die Änderungen der chemischen Verschiebungen und magnetischen Suszeptibilitäten entlang der Reaktionskoordinate für die Reaktion von Ethylen mit Butadien. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 zusammengestellt.

Die Geometrien der einzelnen Punkte auf der Reaktionskoordinate wurden auf ab-initio-RHF/3-21G-Niveau^[12] innerhalb der C_s -Punktgruppe optimiert und als Grundlage für IGLO-

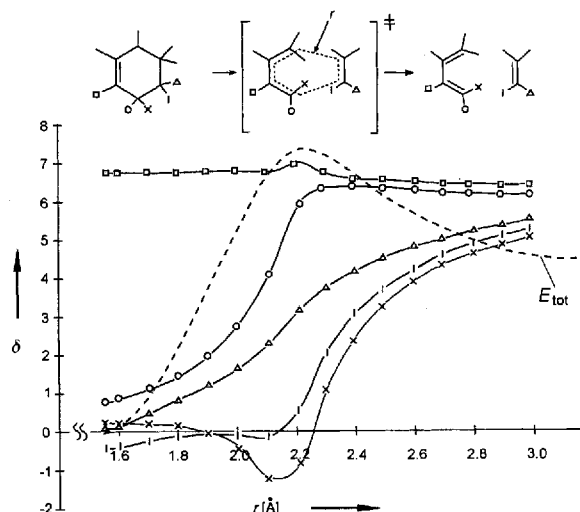


Abb. 1. Berechnete 1H -chemische Verschiebungen bei der Retro-Diels-Alder-Reaktion von Cyclohexen als Funktion der Reaktionskoordinate r . Die Gesamtenergiekurve E_{tot} (Reaktionsprofil) ist als gestrichelte Linie eingezeichnet [8a].

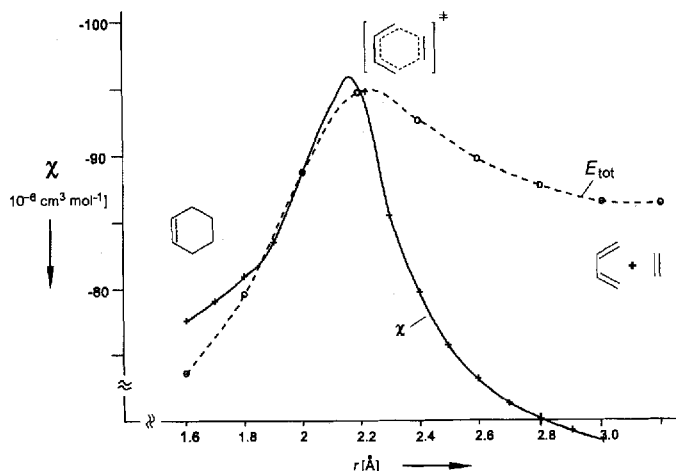


Abb. 2. Berechnete diamagnetische Suszeptibilität χ und Gesamtenergie E_{tot} der Reaktion von Abb. 1 als Funktion der Reaktionskoordinate r .

[*] Priv.-Doz. Dr. R. Herges, Dipl.-Chem. H. Jiao, Prof. Dr. P. von R. Schleyer Computer-Chemie-Centrum Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg Henkestraße 42, D-91054 Erlangen Telefax: Int. + 9131/85-9132

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Die Autoren danken Prof. W. Kutzelnigg für den Hinweis, daß sich auch magnetische Suszeptibilitäten zur Charakterisierung von aromatischen Übergangszuständen eignen. Dr. U. Fleischer hat ebenfalls mit hilfreichen Hinweisen beigetragen. H. J. bedankt sich für ein Stipendium der Shanxi Normal University.