

Synthese eines Bis-Adenosin-Derivates als Analogon zum Übergangszustand der tRNA-abhängigen Peptidkondensation

Frank Seela*) und Friedrich Cramer

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,
D-3400 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

Eingegangen am 9. Oktober 1974

Das Bis-Adenosin-Derivat **6a**, das Strukturelemente von den 3'-terminalen Resten zweier beladener tRNA-Moleküle – Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA – enthält, und sein Monophosphat **6b** werden als Modellverbindungen für den Übergangszustand (Abb. 1, 2) der ribosomalen Peptidsynthese dargestellt. Nach der Theorie des Übergangszustandes für Enzym/Substrat-Wechselwirkungen sollte **6a** besonders fest an das Ribosom gebunden werden und dabei gleichzeitig die Aminoacyl-tRNA- und Peptidyl-tRNA-Bindungsstellen besetzen. Das Bis-Adenosin-Derivat **6a** wurde auf folgendem Wege synthetisiert: Kondensation von Adenosin mit Lävulinsäure-äthylester zur Vorstufe **1a/1b**, alkalische Hydrolyse zu **4a**, Aktivierung zum *N*-Hydroxysuccinimidester **4b** und Kupplung mit 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**5a**). Wird **4b** mit 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-monophosphat (**5b**) umgesetzt, so entsteht das Bis-Adenosin-Phosphat **6b**. **6b** zeigt in vitro starke Inhibition der ribosomalen Peptidsynthese.

Preparation of a Bis-Adenosine Derivative as an Analogue of the Transition State in tRNA-Dependent Peptide Synthesis

The bis-adenosine derivative **6a**, which contains the structural moieties of the 3'-terminal groups of the aminoacyl- and peptidyl-tRNAs, and its monophosphate **6b** have been prepared as model compounds of the transition state (Fig. 1, 2) of the ribosomal peptide synthesis. According to the theory of the transition state for enzyme/substrate interactions, compound **6a** would be strongly bound to the ribosomes blocking simultaneously the aminoacyl- and peptidyl-tRNA binding sites. The synthesis of compound **6a** was accomplished by subsequent condensation of adenosine with ethyl levulinate to **1a/1b**, alkaline hydrolysis to **4a**, activation of **4a** to form the *N*-hydroxysuccinimide ester **4b** and coupling with 3'-amino-3'-deoxyadenosine (**5a**) to compound **6a**. By condensation of compound **4b** with 3'-amino-3'-deoxyadenosine-5'-monophosphate (**5b**) the bis-adenosine phosphate **6b** is obtained. Compound **6b** functions in vitro as an inhibitor of the ribosomal peptide synthesis.

Die tRNA-abhängige ribosomale Peptidsynthese erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die nichtenzymatische chemische Peptidsynthese: Die aktivierte Carbonylgruppe einer aminogeschützten Aminosäure wird mit der freien Aminogruppe der nächsten, carboxylgeschützten Aminosäure zum Säureamid umgesetzt. Im Falle der ribosomalen Peptidsynthese greift eine durch einen tRNA-Rest an der Carboxylgruppe geschützte Amino-

*) Als Gast von der Universität Paderborn-Gesamthochschule, Fachbereich 6 (Organische Chemie), D-4790 Paderborn, Pohlweg 55.

sind nur Zwischenverbindungen enzymatischer Reaktionen; diese weisen gegenüber den eigentlichen Substraten eine erhöhte Komplexbildungstendenz zum entsprechenden Enzym auf⁸⁾. Dies legt nahe, daß auch Analoga von Substraten im Übergangszustand ähnlich gute Komplexbildungseigenschaften zeigen. Wesentliches Merkmal derartiger Analogverbindungen muß einerseits eine weitgehende Ähnlichkeit ihres räumlichen Baus und ihres Ladungsmusters zum Substrat im Übergangszustand sein, andererseits muß ihre Struktur so beschaffen sein, daß weder eine Reaktion zurück zum Substrat noch zum Produkt möglich ist.

Wir entschlossen uns deshalb, eine Analogverbindung zum Übergangszustand der tRNA-abhängigen ribosomalen Peptidsynthese darzustellen, die nur aus den terminalen Adenosingliedern der tRNA besteht und diese in ähnlicher Weise wie beim Übergangszustand verknüpft. Im Bis-Adenosin-Derivat **6a** wurde der aus der Carbonylgruppe der Peptidyl-tRNA gebildete sp³-hybridisierte Kohlenstoff des Übergangszustandes der Abb. 2 durch ein cyclisches Acetal ersetzt. Außerdem wurde der Peptidylaminorest der Peptidyl-tRNA durch Wasserstoff, die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA durch Methylgruppen ersetzt. Zusätzlich wurde statt der Aminoacyl-Adenosin-Esterbindung eine stabile Amidbindung eingeführt. Wenn die Struktur der Analogverbindung **6a** den Übergangszustand hinreichend gut kopiert, dann sollte sie ein effektiver Komplexbildner mit dem Ribosom sein, wobei sie gleichzeitig die Bindungsstellen der Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA (A- und P-site) besetzt. Diese Annahmen lassen sich *in vitro* durch Hemmung eines oder mehrerer Teilschritte der ribosomalen Proteinbiosynthese nachprüfen. Wie erste Experimente zeigen¹⁵⁾, ist **6b** ein Inhibitor der ribosomalen Proteinsynthese. Die biologischen Eigenschaften von **6b** unterstützen damit einerseits das ribosomale Zweibindungsstellenmodell und unterstreichen andererseits, daß Analoga des Übergangszustandes Enzyminhibitoren sein können.

Umsetzung von Adenosin mit Lävulinsäure-äthylester

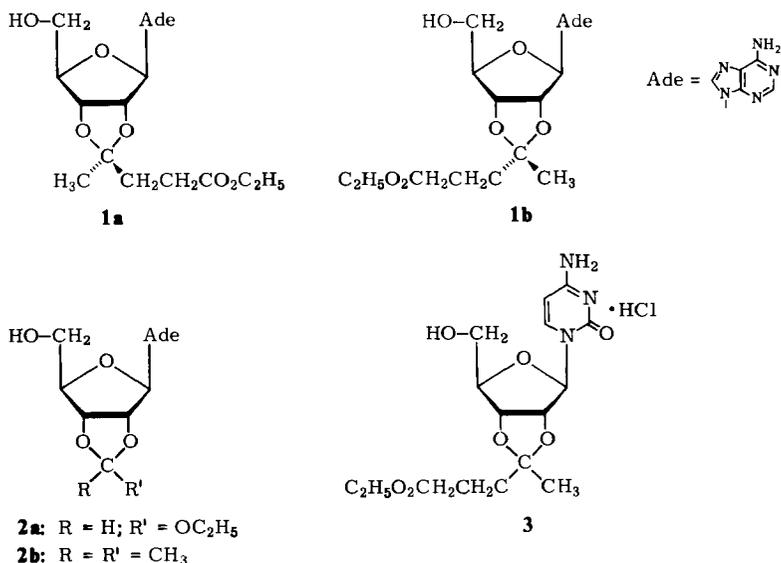
Zur Darstellung des Bis-Adenosin-Derivats **6a** muß zuerst dessen Vorstufe **1a/1b** synthetisiert werden.

Kondensiert man Adenosin mit Lävulinsäure-äthylester in Gegenwart von Orthoameisensäure-triäthylester unter säurekatalysierten Bedingungen, so läßt sich nach zweistündiger Reaktionszeit eine neue Substanz nachweisen, die dünnschichtchromatographisch im LS I langsamer als Adenosin wandert und beim Vergleich mit dem Orthoesterderivat **2a** identisch ist. Arbeitet man das Reaktionsgemisch nicht nach 2 h, sondern erst nach 20 h auf, so kann kein **2a** mehr nachgewiesen werden; vielmehr ist eine neue chromatographisch einheitliche Verbindung entstanden, die auf Kieselgel (LS III) schneller als das Orthoester-Derivat **2a** wandert. Hydrolysiert man eine Probe des Reaktionsproduktes alkalisch, so entsteht eine Säure, die sich dadurch zu erkennen gibt, daß sie in der Dünnschichtelektrophorese (LS IV) im Gegensatz zu Adenosin und auch zu **2a** zur Anode wandert. Da bei alkalischer Hydrolyse nur ein Kondensationsprodukt mit Lävulinsäure-äthylester eine Säure bilden kann, muß es sich bei dem 20-Stunden-Reaktionsprodukt um **1a** bzw. **1b**, bei der daraus gebildeten Säure um **4a** handeln.

⁸⁾ G. J. Cardinale und R. H. Abeles, *Biochemistry* 7, 3970 (1968).

Wird Adenosin hingegen in Abwesenheit von Orthoameisensäure-triäthylester unter Säurekatalyse mit Lävulinsäure umgesetzt, so tritt im Gegensatz zur Reaktion von Ketonen mit weniger C-Atomen auch nach längerer Reaktionszeit praktisch keine Umsetzung ein, was auf sterische Behinderung der Reaktionen durch die sperrigen Reste der Lävulinsäure zurückgeführt werden kann. Bei der Umsetzung von Adenosin mit Lävulinsäureester in Gegenwart von Orthoameisensäureester bildet sich also, offenbar unter kinetischer Lenkung der Reaktion, zuerst das Orthoester-Derivat **2a**, das sich dann aus sterischen Gründen langsam in die thermodynamisch stabilere Verbindung **1a** umwandelt (s. u.).

Die präparative Umsetzung von Adenosin mit Lävulinsäure-äthylester unter den eben genannten Bedingungen liefert unter Vermeidung der alkalischen Hydrolyse in 71 proz. Ausbeute kristallisiertes **1a** bzw. **1b**.



Die gewählten Bedingungen erlauben es auch, andere Nucleoside nach gleichem Muster mit Lävulinsäureester umzusetzen. So entsteht aus der Reaktion mit Cytidin das Derivat **3**, das wegen erhöhter Basizität der Pyrimidinbase zweckmäßig als Hydrochlorid isoliert wird.

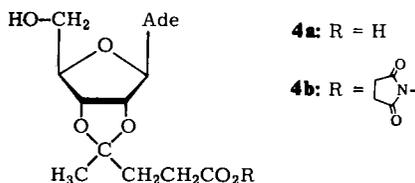
Purin- und auch Pyrimidinnucleoside vom Typ **1/3** sind relativ säurestabil. In 50proz. Essigsäure setzt ihre Spaltung erst merklich oberhalb von 80°C ein. Vergleicht man die Hydrolysebeständigkeit von **1a/1b** und **3** mit dem Isopropylidenderivat **2b** bei 100°C in 50proz. Essigsäure, so zeigt sich nach Chromatographie der Reaktionsprodukte (Kieselgel, LS I), daß **2b** nach einer Stunde völlig gespalten ist, während von **1a/1b** und **3** noch mehr als 50% ungespalten vorliegen. Bei der vollkommenen Hydrolyse von **1a/1b**, zu der 24 h benötigt werden, entsteht neben Adenosin auch immer Adenin, da unter diesen verschärften Bedingungen schon Glycosidspaltung einsetzt.

Bei der Umsetzung von Adenosin mit Lävulinsäure-äthylester können Diastereomere, nämlich **1a** und **1b**, gebildet werden. Die Diastereomeren unterscheiden sich in der Stellung der Acetalreste relativ zur Ribose. Die Entscheidung, ob ein Isomerengemisch oder aus-

schließlich ein Isomeres gebildet wird, gelingt mit Hilfe des NMR-Spektrums. Vergleicht man die NMR-Signale des Kondensationsprodukts von Adenosin und Lävulinsäure-äthylester mit dem Isopropylidenderivat **2b** im Bereich von $\delta = 1.4 - 1.7$ ppm, so fällt auf, daß **2b** zwei Methylsignale unterschiedlicher chemischer Verschiebung bei δ 1.40 und 1.66 ppm besitzt, während das NMR-Spektrum von **1a/1b** nur ein Signal bei δ 1.40 ppm anzeigt. Zwei Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebung, wie sie bei **2b** durch die verschieden starke Abschirmung der Methylgruppen durch den Ribosering beobachtet werden, sollten bei **1a/1b** nur dann auftreten, wenn zwei unterschiedlich abgeschirmte Methylgruppen (*exo*- bzw. *endo*-ständig) zur Ribose vorliegen. Da bei dem Kondensationsprodukt nur ein Signal beobachtet wird, ist gesichert, daß auch nur ein Isomeres entstanden ist. Unterstrichen wird dies auch dadurch, daß sich die Verbindung im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LSI und LSIII) nicht auftrennt. Die ausschließliche Bildung nur eines Isomeren hängt offenbar damit zusammen, daß die Reaktion unter den gewählten Bedingungen thermodynamisch gesteuert abläuft, daß somit das energieärmere (sterisch weniger gespannte) Isomere entsteht.

Die Zuordnung des Isomeren zu den Formeln **1a** bzw. **1b** bleibt offen. Wenn allerdings davon ausgegangen wird, daß im NMR-Spektrum von **2b** die *endo*-Methylgruppe aufgrund der größeren Abschirmung durch den Ribosering bei höherem Feld absorbiert, muß dem Signal bei 1.40 ppm die *endo*-Position zugeordnet werden. Überträgt man diesen Sachverhalt auf das Kondensationsprodukt, dann ist die Methylgruppe *endo*-, der längere Alkylrest *exo*-ständig. Dem Isomeren ist dann Formel **1a** zuzuordnen.

Aus **1a** gewinnt man die Säure **4a** durch Behandeln mit Äthanol/Natronlauge. Hierbei wurde wegen der guten Kristallisationsneigung von **4a** in Wasser gleich nach der Reaktion überschüssige Natronlauge mit saurem Ionenaustauscher abgefangen und **4a** aus der stark eingeeengten Lösung durch Zusatz von Essigsäure auskristallisiert.

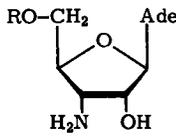


Darstellung des Bis-Adenosin-Derivates **6a** und seines Phosphats **6b**

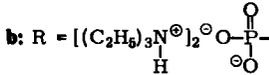
Zur Darstellung von **6a** muß **4a** mit 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**5a**)⁹⁾ kondensiert werden. Die milde Aktivierung der Carboxylgruppe von **4a** durch den *N*-Hydroxysuccinimid-Rest zu **4b** stellt sicher, daß bei der Kondensation mit **5a** der Angriff ausschließlich an der 3'-Aminogruppe, jedoch nicht an der C-6-Aminogruppe oder den Ribosehydroxylen erfolgt. Die Umsetzung, die wegen der schlechten Lösungseigenschaften von **5a** in Hexamethylphosphorsäuretriamid vorgenommen werden muß, liefert ein Substanzgemisch, das sich dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LS I) in eine Hauptzone und mehrere Nebenzone auf trennt. Präparative Chromatographie am Ionenaustauscher bringt die

⁹⁾ N. N. Gerber und H. A. Lechevalier, J. Org. Chem. **27**, 1731 (1962).

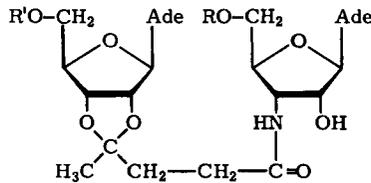
einheitliche Hauptkomponente ins Eluat. Die Substanz der Hauptzone kristallisierte nicht, ließ sich jedoch durch Einengen ihrer methanolischen Lösung farblos und analysenrein ausfällen.



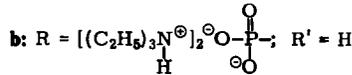
5a: R = H



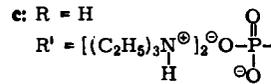
b: R = $[(C_2H_5)_3N^+]_2 \ominus O-P(=O)(OH)-$



6a: R = R' = H



b: R = $[(C_2H_5)_3N^+]_2 \ominus O-P(=O)(OH)-$; R' = H



c: R = H
R' = $[(C_2H_5)_3N^+]_2 \ominus O-P(=O)(OH)-$

Strukturbeweisend für **6a** ist das NMR-Spektrum. Es zeigt im Aromatenbereich insgesamt vier Adeninringprotonen, wobei zwei separiert sind (δ 8.43 und δ 8.37 ppm), die beiden anderen bei δ 8.18 ppm jedoch zusammenfallen. Auch die beiden Multipletts der Riboseprotonen an C-1' bei 6.17 und 6.00 ppm sind ein Indikator für die bezüglich der Adenosinreste „dimere Struktur“. Weiterhin zeigt die UV₂₆₀-Absorption von **6a** die „dimere Struktur“ an: ϵ liegt mit 27900 nur wenig niedriger als für zwei freie Adenosinreste ($\epsilon = 30000$) zu erwarten.

Spaltet man **6a** 2 h in 50proz. Essigsäure bei 100°C und chromatographiert das Reaktionsprodukt in Kieselgel (LS I), so trennt es sich (neben Substanz am Start) in drei Zonen auf. Beim chromatographischen Vergleich ist der Inhaltsstoff der am schnellsten wandernden Zone mit Adenosin, der der langsamen mit Adenin identisch; die mittlere Zone enthält vermutlich an 3'-N durch Lävulinsäure acyliertes **5a**.

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von **6a** ließen sich beim biologischen Test keine ausreichenden Konzentrationen erzielen. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit wurde **6a** phosphoryliert. Die ausschließliche Phosphorylierung an den Hydroxylgruppen von C-5', die wegen struktureller Ähnlichkeit zu den entsprechenden tRNA-Molekülen als sinnvoll erschien, erfolgte nach bekanntem Verfahren^{10,11}. Bei der Phosphoroxchlorid-Umsetzung in Triäthylphosphat entstehen aus **6a** zwei Reaktionsprodukte, die bei der Elektrophorese zur Anode wandern und an Austauschercellulose getrennt werden konnten. Der Inhaltsstoff der zuerst eluierten Zone wandert in der Elektrophorese mit R_F 0.07, der der danach eluierten mit 0.22; beide bezogen auf AMP. Sie lassen sich durch Behandeln mit alkalischer Phosphatase¹² in identische phosphatfreie Spaltprodukte umwandeln, die beim chromatographischen Vergleich mit **6a** identisch sind. Bei den Phosphorylierungsprodukten von **6a** handelt es sich vermutlich um die isomeren Phosphate **6b** und **6c**.

¹⁰⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, *tetrahedron Lett.* **1967**, 5065.

¹¹⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Japan* **42**, 3505 (1969).

¹²⁾ A. Torriani in: *Procedures in Nucleic Acid Research*, G. L. Cantoni und D. R. Davies, Bd. 1, S. 244, Harper und Row, New York, N. Y. 1966.

Da die Phosphorylierung von **6a** nicht so zu lenken war, daß nur ein Phosphorylierungsprodukt entsteht, wurde das Monophosphat von **6a** auf anderem Wege dargestellt. Phosphoryliert man nicht **6a**, sondern seine Vorstufe **5a**, so ist die Stellung des Phosphatrestes im Kondensationsprodukt von der Synthese her festgelegt. Behandlung von **5a** „unter **6a**-Bedingungen“ liefert **5b** als Hauptprodukt der Reaktion¹³⁾. Das Phosphat **5b** wird durch Salzgradientenelution an Austauschercellulose von Nebenprodukten befreit und fällt als reines Triäthylammoniumsalz an. Es wandert in der Elektrophorese mit dem gleichen R_F -Wert wie AMP. Bei Behandlung mit alkalischer Phosphatase wird **5b** in seine Ausgangsverbindung **5a** umgewandelt, gesichert durch chromatographischen und elektrophoretischen Vergleich mit reinem **5a**. Setzt man **5b** unter gleichen Bedingungen wie **5a** mit **4b** um, so erhält man nach Austauschchromatographie durch Salzgradientenelution **6b**.

Die Struktur des Phosphates **6b** wurde auf zwei Wegen bewiesen: Durch Abspaltung des Phosphatrestes mit alkalischer Phosphatase¹²⁾ entsteht **6a** als einziges Reaktionsprodukt, was durch chromatographischen Vergleich in LS I sichergestellt wurde. Der Phosphatgehalt von **6b** wurde quantitativ durch Veraschen der Substanz und Umsetzen mit Ammoniummolybdat photometrisch bei 820 nm bestimmt¹⁴⁾. Dabei erhält man aus der Ausgangsverbindung die äquimolare Menge Phosphat; aus 0.042 μmol **6b** ($\epsilon = 27900$) entstehen 0.040 μmol Phosphat. Beim chromatographischen und elektrophoretischen Vergleich von **6b** mit den Zonen I und II des Phosphorylierungsproduktes von **6a** zeigt nur Zone I mit **6b** gleiches chromatographisches Verhalten. Diese Befunde zeigen, daß der Inhaltsstoff der Zone I mit **6b** identisch ist, und legen nahe, daß der von Zone II dem isomeren Phosphat **6c** zugeordnet werden muß.

Über die biologische Aktivität von **6b** wird an anderer Stelle¹⁵⁾ berichtet.

Herrn Dr. *Dieter Gauss* danken wir für hilfreiche Diskussion bei der Abfassung der Arbeit.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop der Firma Reichert, Österreich, bestimmt und sind nicht korrigiert. Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor *Beller*, Göttingen. NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (Tetramethylsilan als innerer Standard). UV-Spektren: Zeiss PMQ II- bzw. Shimadzu UV-200-Spektrometer.

Chromatographie: Bei der Säulenchromatographie wurden Celluloseaustauscher DE 52 (Firma Whatman) und ein LKB-Fraktionssammler mit Uvicord verwendet. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgel-Dünnschichtplatten F 254 (Firma Woelm, Eschwege) ausgeführt, als Substanznachweis diente die UV_{260} -Absorption. Der 1 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat (TBK)-Puffer wurde durch Einleiten von Kohlendioxid in eine Mischung von 4280 ml Wasser und 720 ml Triäthylamin bis zum Erreichen von pH 7.0 hergestellt.

Als Lösungsmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie wurden LS I (0.25 M Lithiumchlorid), LS II (0.75 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3.5) und LS III (Chloroform/Äthanol 9 : 1) benutzt.

¹³⁾ *M. Morr* und *M. R. Kula*, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 23.

¹⁴⁾ *P. S. Chen*, *T. Y. Toriba* und *H. Warner*, *Anal. Chem.* **28**, 1756 (1966).

¹⁵⁾ *V. A. Erdmann*, *F. Seela*, *F. Cramer* et al., in Vorbereitung.

Elektrophorese: Die Dünnschichtelektrophorese wurde in einer DE-Doppelkammer (Firma Desaga, Heidelberg) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Firma Woelm, Eschwege) oder Cellulose-Fertigplatten (Firma Merck, Darmstadt) durchgeführt. Folgende Elektrophoresepuffer wurden benutzt: LS IV (0.1 M Sörensen/Citratpuffer, pH 6.5), LS V (0.1 M Natriumformiatpuffer, pH 3.5), LS VI (0.1 M (TBK)-Puffer, pH 7.0) und LS VII (0.1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 8.5).

Phosphatasespaltung: 10 µl Enzymsuspension (Alkalische Phosphatase, EC 3.1.3.1, Firma Boehringer, Mannheim, Nr. 15429, 1 mg/ml) werden mit 90 µl 0.25 M TRIS-HCl-Puffer pH 8.0 verdünnt. 10 µl dieser Lösung werden mit 10 µl des zu spaltenden Substrates 2 h bei 37°C aufbewahrt.

Phosphatbestimmungsreagenz: Lösung a: 10proz. Ascorbinsäure; Lösung b: 0.42proz. Ammoniummolybdat · 4 H₂O in 1 N H₂SO₄; Lösung c: Ein Teil Lösung a und 6 Teile Lösung b. Zur Bestimmung werden 0.70 ml der frisch bereiteten Lösung c mit 0.30 ml der zu bestimmenden Phosphatlösung versetzt.

3'-Amino-3'-desoxyadenosin wurde aus dem Kulturfiltrat von *Helminthosporum* sp. 215 isoliert⁹⁾ und uns von der *Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH*, Stöckheim, überlassen.

Lävulinsäure-äthylester-(O^{2',3'}-adenosin-acetal) (1): 6.1 g (22.9 mmol) Adenosin werden unter Rühren in 75 ml wasserfreiem Dimethylformamid suspendiert und nach Zugabe von 7.5 ml (7.575 g = 52.5 mmol) Lävulinsäure-äthylester und 5 ml (30 mmol) Orthoameisensäure-triäthylester durch 10 ml 7 M Chlorwasserstoff in Dioxan in Lösung gebracht. Nach 20stündigem Aufbewahren bei Raumtemp. wird in 1000 ml Äther gegossen und der ölige Rückstand zweimal mit Äther gewaschen. Der durch Zusatz von 2proz. Natriumhydrogencarbonat in Chloroform lösliche Ätherrückstand wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform abgedampft. Es ergeben sich 7.0 g gelbliche Substanz. Diese liefert aus Äthylacetat/Petroläther 6.4 g (71%) farblose Prismen von Schmp. 149°C. Auf der Kieselgeldünnschichtplatte (LS III bzw. LS I) wandert die Substanz einheitlich.

UV (Methanol): λ_{max} 259 nm (ε = 15200). — NMR (CDCl₃): t 1.28 (3), J = 7.0 Hz, s 1.37 (3), m um 2.4 (4), m um 3.9 (2), q 4.18 (2), J = 7.0 Hz, m 4.53 (1), m 5.2 (2), d 6.05 (1), J = 3 Hz, s 7.95 (1), s 8.30 (1), NH₂ 6.3 ppm.

C₁₇H₂₃N₅O₆ (393.4) Ber. C 51.90 H 5.89 N 17.80 Gef. C 52.08 H 6.00 N 17.65

Lävulinsäure-äthylester-(O^{2',3'}-cytidin-acetal)-hydrochlorid (3): 4.86 g (20 mmol) Cytidin suspendiert man unter Rühren in 50 ml Dimethylformamid, versetzt mit 5.76 g (40 mmol) Lävulinsäure-äthylester, 5 ml (30 mmol) Orthoameisensäure-triäthylester und 10 ml 7 M Chlorwasserstoff in wasserfreiem Dioxan. Die jetzt klare Lösung wird 40 h bei Raumtemp. gerührt, wobei farblose Kristalle ausfallen. Nach Eintragen des Reaktionsgemisches in 500 ml Äther fallen 8.0 g farblose Kristalle an. Aus Äthanol erhält man 6.8 g (84%) farblose Plättchen vom Schmp. 204–205°C.

UV (Methanol): λ_{max} 270 nm (ε = 7750), 239 (7400). NMR ([D₆]DMSO): t 1.20 (3), J = 7 Hz, s 1.30 (3), m um 2.3 (4), m 3.63 (2), q 4.13 (2), J = 7 Hz, m 4.32 (1), m 4.95 (2), m 5.9 (1), d 6.28 (1), J = 7.5 Hz, d 8.25 (1), J = 7.5 Hz, s 8.95 (1), s 10.10 (1) ppm (breit).

[C₁₆H₂₄N₃O₇]Cl (405.9) Ber. C 47.35 H 5.96 Cl 8.74 N 10.35
Gef. C 47.49 H 6.05 Cl 8.63 N 10.54

Lävulinsäure-(O^{2',3'}-adenosin-acetal) (4a): 1.0 g Lävulinsäure-äthylester-(O^{2',3'}-adenosin-acetal) (1) werden in 60 ml Äthanol/1 N NaOH (1:1) gelöst und 30 min bei Raumtemp. aufbewahrt. Durch Zusatz von Ionenaustauscher (Amberlite, H⁺-Form) wird an der Glaselektrode neutralisiert. Nach Abfiltrieren und Auswaschen des Ionenaustauschers mit Äthanol/Wasser (1:1) wird

abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und die Substanz durch Zusatz von 1 M Essigsäure auskristallisiert. 705 mg (76 %) farblose Plättchen vom Schmp. 225 °C.

UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm ($\epsilon = 14600$).

$C_{15}H_{19}N_5O_6$ (365.4) Ber. C 49.31 H 5.24 N 19.17 Gef. C 49.37 H 5.29 N 19.14

Lävulinsäure-(N-Hydroxysuccinimidester)-(O^{2',3'}-adenosin-acetal) (**4b**): 576 mg (1.6 mmol) **4a** und 184 mg (1.6 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 10 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid gelöst, auf 5 °C abgekühlt, mit 330 mg (1.6 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 12 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Filtration verdünnt man mit dem zehnfachen Vol. Wasser, extrahiert mit Chloroform, wäscht dieses mit Wasser, filtriert die Chloroformphase und dampft ab. Der Rückstand läßt sich aus Isopropylalkohol kristallisieren. 400 mg (55 %) farblose Kristalle, die bei 160 °C schmelzen und auf der Dünnschichtplatte (LS III) einheitlich wandern.

$C_{19}H_{22}N_6O_8$ (462.4) Ber. C 49.35 H 4.80 N 18.18 Gef. C 49.58 H 4.92 N 18.23

N-(3'-Desoxyadenosin-3'-yl)lävulinsäureamid-(O^{2',3'}-adenosin-acetal) (**6a**): 139 mg (0.3 mmol) **4b** werden bei Raumtemp. in eine in der Wärme bereitete Lösung von 78 mg (0.3 mmol) 3'-Amino-3'-desoxyadenosin⁹⁾ (**5a**) in 12 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid eingetragen und 10 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Hochvak. bleibt eine farblose, ölige Substanz zurück, die sich auf der Kieselgeldünnschichtplatte (LS III) in eine langsam wandernde Hauptzone, eine schnell wandernde Nebenzone und wenig Substanz am Start auftrennt. In der DC-Elektrophorese (LS IV) wandert das Reaktionsprodukt nicht. Bei präparativer Ionenaustauschchromatographie an einer 3.2 × 25-cm-Säule (Dowex 1-X2, 200–400 mesh*) eluiert Methanol/Wasser (3:7) Vorzonen geringer optischer Intensität, Methanol/Wasser (1:1) eine stärkere Nebenzone (erscheint manchmal erst beim nächsten Elutionsschritt), Methanol/Wasser (7:3) die gesuchte Substanz. Nach Abdampfen des Lösungsmittels, Aufnehmen in Äthanol und Einengen fallen erst 88 mg, dann aus der Mutterlauge weitere 16 mg farblose Kristalle aus (57 %). Die auf der Kieselgel-Dünnschichtplatte (LS I) einheitliche Substanz schmilzt bei 168–170 °C.

UV (Methanol): λ_{\max} 260 nm ($\epsilon = 27900$).

$C_{25}H_{32}N_{11}O_8$ (613.6) Ber. C 48.94 H 5.09 N 25.11 Gef. C 48.61 H 5.39 N 24.82

Phosphorylierung von 6a: 6.1 mg (10 μ mol) **6a** werden in 50 μ l wasserfreiem Triäthylphosphat gelöst und bei 0 °C mit 3 μ l (33 μ mol) Phosphoroxchlorid versetzt. Der sich dabei bildende gallertige Niederschlag löst sich nach kurzem Stehenlassen wieder auf. Nach 2½stündigem Aufbewahren im Kühlschrank (4 °C) hydrolysiert man mit einem Stückchen Eis, alkalisiert mit 10 μ l Triäthylamin und dampft i. Ölpumpenvak. ab. Der Abdampfückstand wird in 30 ml Wasser gelöst und an einer 20 × 2-cm-Austauschersäule (Cellulose DE-52) adsorbiert. Wasser eluiert nicht-phosphorylierte Substanz, Salzlösung ((TBK)-Puffer-Gradient; 400 ml 1.0 M (TBK)-Lösung/400 ml Wasser) eluiert im wesentlichen zwei Hauptzonen. Die Eluate der schnell wandernden Hauptzonen (Zone I und II) dampft man ab, vertreibt überschüssiges Triäthylamin durch Schleppen mit Äthanol und lyophilisiert die glasigen Abdampfückstände nach Lösen in wenig Wasser.

Inhaltsstoff der Zone I: Farblose amorphe Substanz, elektrophoretische Mobilität (LS IV) 0.07 (+) relativ zu AMP, DC (Kieselgel, LS IV), $R_F = 0.26$ relativ zu AMP. Bei enzymatischer Spaltung mit alkalischer Phosphatase¹²⁾ entsteht **6a**.

Inhaltsstoff der Zone II: Farblose amorphe Substanz, elektrophoretische Mobilität (LS IV) 0.22 (+) relativ zu AMP, DC (Kieselgel, LS IV), $R_F = 0.35$ relativ zu AMP. Bei enzymatischer Spaltung mit alkalischer Phosphatase¹²⁾ entsteht **6a**.

Bis(triäthylammonium)-3'-amino-3'-desoxyadenosin-5'-phosphat (**5b**): 104 mg (0.4 mmol) 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**5a**) werden in der Siedehitze in 20 ml Triäthylphosphat gelöst (geringer Rückstand), auf 4 °C abgekühlt und mit 150 μ l (1.6 mmol) Phosphoroxchlorid versetzt. Nach 2 h

* Mit 1 N NaOH aus der Chloridform in die OH-Form gewaschen.

setzt man zwei Eisstückchen zu, alkalisiert mit Triäthylamin und dampft i. Hochvak. bis zur Trockene ab. Der in 200 ml Wasser gelöste Rückstand wird an einer 35×3 -cm-Austauschersäule (Cellulose DE-52) adsorbiert. Wasser eluiert eine breite Vorzone, der Salzgradient (1000 ml 0.5 M (TBK)-Puffer/1000 ml Wasser) trennt eine Hauptzone von schneller und langsamer wandernden Nebenzonen ab. Nach Eindampfen des Eluats und Nachdampfen von Äthanol erhält man 2200 A_{260} -Einheiten (36%) farbloses **5b**. – UV (Wasser): λ_{\max} 260 nm.

Elektrophoretische Mobilität von **5b** und Vergleich mit **5a**, Adenosin und AMP

| | Cellulose | | Kieselgel | |
|-----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | LS VI | LS V | LS IV | LS V |
| 5b | 1.00 (+) | 6.0 (–) | 0.47 (+) | 0.75 (–) |
| 5a | 0.33 (–) | 12.0 (–) | 0.15 (–) | 4.00 (–) |
| Ado | 0.50 (–) | 5.0 (–) | – | 1.35 (–) |
| AMP | 1.00 (+) | 1.00 (+) | 1.00 (+) | 1.00 (+) |

In der Dünnschichtchromatographie (LS I) wandert **5b** mit R_F 0.73, **5a** mit 0.79 und Adenosin mit 0.90; alles bezogen auf AMP.

N-(3'-Desoxy-5'-phosphoadenosin-3'-yl)lävulinsäureamid-($O^{2',3'}$ -adenosin-acetal), Bis(triäthylammonium)-Salz (**6b**): 69 mg (0.15 mmol) Succinimidester **4b** in 9 ml Dimethylformamid werden mit 60 mg **5b**, gelöst in 3 ml H_2O , versetzt. Nach Zugabe von 25 μ l Triäthylamin rührt man 6 h, versetzt mit weiteren 75 μ l Triäthylamin und dampft i. Hochvak. ab. Nach Lösen des farblosen schaumigen Rückstandes in 200 ml Wasser chromatographiert man an einer 35×3 -cm-Austauschersäule (Cellulose DE-52). Wasser eluiert eine breite Vorzone, der Salzgradient (1000 ml 0.5 M (TBK)-Puffer pH 7.0/1000 ml H_2O) neben Vorzonen eine Hauptzone. Nach Eindampfen des Eluats der Hauptzone und Nachdampfen mit Äthanol und Wasser erhält man 1500 A_{260} -Einheiten (36%) farbloses glasiges **6b**, das nach Lösen in wenig Wasser und Lyophilisation als farblose amorphe Substanz anfällt. Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LS I) wandert **6b** einheitlich und mit 0.30 des R_F -Wertes von AMP. In der Elektrophorese auf Kieselgel (LS VII) wandert **6b** mit R_F 0.10 (+), die Säure **4a** mit 0.20 (+) und **6a** mit 0.07, im LS V wandert **6b** nicht, **4a** mit R_F 0.06 (–) und **6a** mit 0.16 (–); alles bezogen auf AMP. – UV (Wasser): λ_{\max} 260 nm.

Spaltung von 6b mit alkalischer Phosphatase: Behandelt man **6b** mit alkalischer Phosphatase¹², so entsteht ausschließlich **6a**, was durch chromatographischen Vergleich einer Probe mit authentischem **6a** auf Kieselgel (LS I) gezeigt werden konnte; auch besitzt es gleiche elektrophoretische Mobilität (Cellulose, LS IV).

Quantitative Phosphatbestimmung von 6b: 1.14 A_{260} -Einheiten (0.042 μ mol*) **6b** und als Standard 0.96 A_{260} -Einheiten (0.064 μ mol*) AMP in 20 μ l Wasser werden im Duran-Reagenzglas (12 \times 75 mm) nach Zugabe von 60 μ l 10proz. äthanolischer $Mg(NO_3)_2$ -Lösung verascht, 15 min mit 0.3 ml 1 N HCl auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert, nach dem Abkühlen mit 0.7 ml Phosphatreagenz (Lösung c) versetzt und nach einstündigem Aufbewahren bei 37°C die Extinktion bei 820 nm bestimmt.

Eingesetzte Substanzmenge: 1.14 A_{260} -Einheiten **6b***) \pm 0.042 μ mol **6b**; bzw. 0.96 A_{260} -Einheiten AMP*) \pm 0.064 μ mol AMP (Standard). Bestimmte Phosphatmenge: aus **6b** 0.97 A_{820} -Einheiten Farbstoff**) \pm 0.040 μ mol Phosphat bzw. aus AMP 1.64 A_{820} -Einheiten Farbstoff**) \pm 0.068 μ mol Phosphat.

*) 1 μ mol AMP = 15 A_{260} -Einheiten, 1 μ mol **6b** = 27.9 A_{260} -Einheiten.

**) 1 μ mol Phosphat \pm 24 A_{820} -Einheiten Farbstoff.