

Notizen

Synthese der Cycloamide der *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure* und *-5'-thionophosphorsäure*, zweier neuer cAMP-Analoga

Michael Morr

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung,
Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim, und

Rudolf Mengel*

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,
Postfach 7733, D-7750 Konstanz

Eingegangen am 2. Mai 1977

Synthesis of the Cycloamides of *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosine-5'-phosphoric Acid* and *-5'-thionophosphoric Acid*, two New cAMP Analogues

xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosine (1) reacts with phosphoryl chloride or with thiophosphoryl chloride to yield the adenosine-3',5'-cyclophosphates **3a** or **3b**, respectively, in high yields.

In der letzten Zeit sind eine Reihe von Arbeiten über Cycloamido-Derivate des Adenosin-3',5'-cyclophosphats erschienen¹⁻⁵⁾, wobei sich erwartungsgemäß die P–N-Bindung der P=S-Derivate als hydrolysestabiler erwies als die der P=O-Derivate²⁾. Wir berichten über die Synthese von Derivaten des *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-3',5'-cyclophosphats* **3**. Man sollte aufgrund der geringeren Ringspannung im Cyclophosphatring eine größere Stabilität der P–N-Bindung erwarten als bei den *ribo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin*-Derivaten. Die Synthese der Cyclophosphat-Analogen **3** gelang in einem Eintopfverfahren mit hoher Ausbeute.

Das Cycloamid **3a** des *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-monophosphats* wurde aus *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin* (1)⁶⁾ nach der Phosphorylierungsmethode von Yoshikawa⁷⁾ in Phosphorsäure-triethylester mit Phosphoroxychlorid hergestellt.

Wie kürzlich beobachtet⁸⁾, erfolgt bei 3'-Aminonucleosiden die Phosphorylierung nicht an der 5'-Hydroxylgruppe, sondern unter Ausbildung einer Phosphoramid-Bindung an der 3'-Aminogruppe unter Bildung von **2a**⁸⁾. **2a** wurde ohne Isolierung durch alkalische Hydrolyse bei pH 9.5 zum Cyclophosphat-Analogen **3a** umgesetzt. Erleichtert wird der Ringschluß durch die günstige

¹⁾ A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer und H. Hettler, J. Org. Chem. **36**, 3029 (1971).

²⁾ B. Jastorff und T. Krebs, Chem. Ber. **105**, 3192 (1972).

³⁾ M. Morr, M.-R. Kula, G. Roesler und B. Jastorff, Angew. Chem. **86**, 308 (1974); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **13**, 280 (1974).

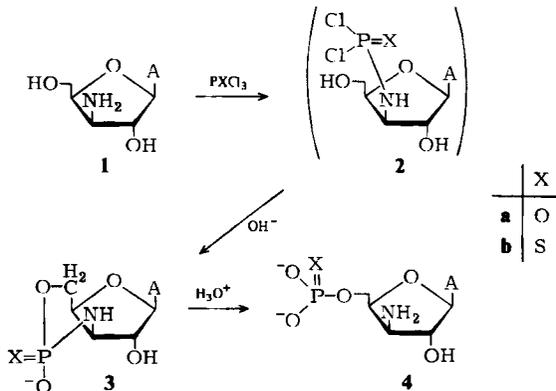
⁴⁾ M. Morr, M.-R. Kula und L. Ernst, Tetrahedron **31**, 1619 (1975).

⁵⁾ M. Morr, Tetrahedron Lett. **1976**, 2127.

⁶⁾ M. J. Robins, Y. Fouron und R. Mengel, J. Org. Chem. **39**, 1564 (1974).

⁷⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Lett. **1967**, 5065.

⁸⁾ M. Morr und L. Ernst, in Vorbereitung.



sterische Anordnung der Dichlorophosphoramid-Gruppierung und der 5'-Hydroxylgruppe im nicht isolierten Zwischenprodukt 2. Die Reinigung der Cyclisierungsprodukte 3 erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex.

Das Cycloamid 3b des *xyl*-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-thionophosphats wurde durch Thiophosphorylierung von 1 in Pyridin mit Thiophosphorylchlorid und anschließende alkalische Hydrolyse bei pH 9.5 in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

Die Konstitution von 3a und 3b wurde durch die ^1H - und ^{31}P -Kernresonanz-Spektren sowie durch saure Hydrolyse zu 4a bzw. b bewiesen. Der Wert der ^{31}P -Kernresonanz von 3a ($\delta = -3.47$) ist ähnlich dem Wert des Cycloamids der 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure ($\delta = -5.8$)⁴⁾. Die Synthese von 3b verläuft nicht stereoselektiv. Die Diastereomeren liegen etwa im Verhältnis 1:5 vor. Die gefundenen Werte für die ^{31}P -Kernresonanz ($\delta = -52.8$ und -54.4 , gemessen in D_2O) liegen in der Größenordnung der Werte, die von uns für das Cycloamid der 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-thionophosphorsäure (-57.5 ; -59.0)⁸⁾ sowie von Eckstein⁹⁾ für das Adenosin-3',5'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat (-53.22 ; -54.27) und von Jastorff¹⁰⁾ für das Cycloamid der 5'-Amino-5'-desoxyadenosin-3'-thionophosphorsäure (-59.0 ; -60.6) gefunden wurden.

Ein Ringschluß zur 2'-Hydroxylgruppe kann aufgrund dieser Werte ausgeschlossen werden, da für entsprechende 2',3'-Cyclothionophosphate Verschiebungen von z. B. $\delta = -76.6$ bzw. -79.6 ⁸⁾ oder -76.1 bzw. -74.8 ¹¹⁾ gefunden wurden.

Verbindung 3a erwies sich bei der sauren Hydrolyse als wesentlich stabiler als das entsprechende Cycloamid des 3'-Amino-3'-desoxyadenosins⁴⁾. Nach 48 Stunden bei 37°C trat bei pH 7 keine P-N-Spaltung ein. Bei pH 5 waren nach 5 h etwa 20% zu 4a gespalten. 3b war bei pH 5 und 7 bei 37°C über 24 h völlig stabil. Bei pH 2 und 3 wurde neben der Spaltung der P-N-Bindung zu 4b auch eine Entschwefelung zu 4a beobachtet.

Über die biologische Aktivität der neuen cAMP-Analogen wird an anderer Stelle berichtet.

⁹⁾ F. Eckstein, L. P. Simonson und H. P. Bär, *Biochemistry* **13**, 3806 (1974).

¹⁰⁾ B. Jastorff, persönliche Mitteilung.

¹¹⁾ D. A. Usher, E. S. Erenrich und F. Eckstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 115 (1972).

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Cellulose-Platten (Merck) I, DC-Kieselgel-Platten (Riedel) II und DC-Aluminium-Oxid-Platten (Merck) III. Laufmittel: Isopropylalkohol/Ammoniak (konz.)/Wasser (7:1:2) (A), Ethanol/1 M NH_4Ac (7:3) (B), *n*-Propanol/Ammoniak (konz.)/Wasser (8:0.5:1.5) (C). — Elektrophorese: Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl, Laufmittel 0.05 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer. 3000 V, ≈ 10 mA.

Cycloamid 3a der *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure*: 91 mg $1^{(6)}$ (0.32 mmol) in 5 ml frisch destilliertem Phosphorsäure-triethylester wurden bei 0°C mit 155 μl (1.7 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Die Umsetzung war nach 3 h vollständig. Nach anschließender Hydrolyse in 100 ml Eiswasser bei pH 9.5 (pH-Stat mit 0.2 N NaOH, Radiometer, Kopenhagen) für 1 h bei 0°C ließ man auf Raumtemp. erwärmen und schüttelte 5 mal mit je 100 ml Ether aus. Die wäßrige Lösung wurde auf 200 ml verdünnt und über eine DEAE-Sephadex-A-25-Säule (HCO_3^- -Form) mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.25 M Triethylammoniumhydrogencarbonat chromatographiert. Das triethylammoniumchlorid-haltige cyclische Nucleotid wurde zur Entsalzung auf einer präparativen Dünnschichtplatte (Kieselgel) mit Methanol chromatographiert. Nach Abkratzen und Elution der nucleotidhaltigen Zone mit Methanol erhielt man etwa 110 mg (80%) **3a** als amorphes, farbloses, chromatographisch einheitliches Triethylammoniumsalz. DC: $R_F = 0.26$ IA; 0.22 IB; 0.52 IIA; 0.35 IIIC. Elektrophorese: 0.95 (cAMP = 1).

NMR (D_2O): $\delta = 3.83$ ($\approx t$, 1, 3'-H), 4.2–4.6 (m, 4, 2', 4', 5'-H), 5.8 (d, $J \approx 2$ Hz, 1'-H), 7.9 (s, 1, 2-H), 8.24 (s, 1, 8-H). — ^{31}P -NMR (D_2O): $\delta = -3.47$.

Cycloamid 3b der *xylo-3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-thionophosphorsäure*: 100 mg $1^{(6)}$ (0.38 mmol) in 100 ml wasserfreiem Pyridin wurden bei 0°C tropfenweise mit einer Lösung von 43 μl (0.42 mmol) Thiophosphorylchlorid in 5 ml Pyridin versetzt. Man ließ noch einige Stunden bei Raumtemp. rühren und gab dann den Ansatz tropfenweise in 100 ml Eiswasser. Mit einem pH-Stat wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0.2 N NaOH auf 9.5 gehalten. Nach der Hydrolyse wurde i. Vak. eingengt, mit 200 ml Wasser aufgenommen und an einer DEAE-Sephadex-A25-Säule (HCO_3^- -Form) mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.25 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer chromatographiert. Ausb. 140 mg (83%) **3b** als amorphes, farbloses, chromatographisch einheitliches Triethylammoniumsalz. DC: $R_F = 0.36$ IA; 0.27 IB; 0.58 IIA; 0.48 IIIC. Elektrophorese: 0.6 (cAMP = 1). Test auf Schwefel²⁾: positiv.

NMR (D_2O): $\delta = 3.74$ (m, 1, 3'-H), 4.2–4.6 (m, 4, 2', 4', 5'-H), 5.88 (d, $J = 2$ Hz, 1'-H), 7.97 (s, 1, 2-H), 8.37 (s, 1, 8-H). — ^{31}P -NMR (D_2O): $\delta = -52.8$ und -54.4 .

Hydrolyse-Versuche: Umwandlung von 3a bzw. 3b in 4a bzw. 4b: Je 1 mg 3a und 3b wurden in einem Eppendorf-Röhrchen in je 100 μl Pufferlösung (pH 3, 4, 5, 7) gelöst und auf 37°C erwärmt. Stündlich wurden je 2 μl der Probe auf analytischen Kieselgelplatten chromatographiert (Elutionsmittel Methanol). Im Unterschied zu den cyclischen Verbindungen 3a und 3b bleiben 4a und 4b am Start sitzen. Die Verbindungen 4a und 4b wurden durch Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie charakterisiert:

4a: DC: $R_F = 0.07$ (A); 0.06 (B). Elektrophorese: 1.45 (c-AMP = 1).

4b: DC: $R_F = 0.08$ (A); 0.07 (B). Elektrophorese: 1.5 (c-AMP = 1); Test auf Schwefel²⁾: positiv.