

Immobilisierung von Adenosinacetalen mit variablem Alkylidienrest — die Funktion des Spacers bei enzymatischer Desaminierung

Immobilization of Adenosine-Acets with Variable Alkylidene Residues

— the Function of the Spacer during Enzymatic Deamination —

Frank Seela, Johann Ott und Helmut Rosemeyer

Universität Paderborn-Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie), Warburger Str. 100,
D-4790 Paderborn

Z. Naturforsch. 34 c, 350–358 (1979); eingegangen am 30. 12. 1978/12. 2. 1979

Cyclic O-2',3'-Adenosine-acetals, Affinity Resins, Spacer, Adenosine Deaminase

Acetalation of the *cis*-diol moiety of adenosine or inosine with aliphatic ketoesters of different chain lengths leads to alkylidene derivatives of the nucleosides, which differ in the number of methylene groups in the hydrocarbon chain. By alkaline hydrolysis of the ester group in **1a–c** or **3a–c** the corresponding acids **2a–c** and **4a–c** have been prepared.

The configuration of the new chiral centres has been determined as R.

Enzymatic deamination of the alkylidene derivatives of adenosine leads to the inosine compounds. The rate of deamination reaction is raised by an increasing number of methylene groups in the alkylidene residues or by use of the esters instead of the acids.

The alkylidene derivatives of adenosine were coupled with 6-aminoxyhexylagarose yielding polymers with adenosine as ligands.

No enzymatic deamination of the polymer with the shortest spacer was observed. The polymers with the longer spacers were converted to the corresponding inosine derivatives. The velocity of the deamination reaction was raised by an increasing spacer length.

Bei der kovalenten Verknüpfung biologisch aktiver Naturstoffe mit polymeren Trägern wird zwischen die Polymermatrix und den niedermolekularen Liganden häufig eine Alkylkette eingeführt, die den Liganden in einem gewissen Abstand (Spacer [1]) zur polymeren Oberfläche hält und damit sicherstellen soll, daß er für einen hochmolekularen Reaktionspartner frei zugänglich ist [2].

Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, daß die Länge des Spacers einen starken Einfluß auf die Bindungsstärke zwischen immobilisiertem Liganden und affinem Partner ausübt [3, 4]. Bei Polymer-Derivaten, die den Spacer-Arm enthalten und erst dann mit dem Liganden gekuppelt werden, können zwar Reaktionen an biospezifischen Polymeren untersucht werden, unklar bleibt jedoch, inwieweit schon der Spacer die Reaktivität der Monomeren verändert.

Wir haben vor einiger Zeit eine Methode zur Immobilisierung von Ribonucleosiden entwickelt, die generell auf diese Verbindungsklasse anwendbar ist, und die neben einer kupplungsfähigen Gruppe Strukturelemente eines Spacer-Restes in das Molekül einführt [5–8].

Sonderdruckanforderungen an Prof. F. Seela.

0341-0382 / 79 / 0500-0350 \$ 01.00/0

Acetalisierung der *cis*-diolischen Hydroxylgruppen von Ribonucleosiden mit Ketoestern führt so zu O-2',3'-Alkylidien-Derivaten, deren Abstand zwischen Acetal und Estergruppe im Alkylidienrest variabel ist. Diese sollten es erlauben, den Einfluß der Kettenlänge des Alkylidienrestes auf den enzymatischen Umsatz des Liganden durch nucleosidumwandelnde Enzyme zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Darstellung von Adenosin- und Inosin-Acetalen mit variablem Alkylidien-Rest, sowie deren Kupplung mit 6-Aminohexyl-agarose. Darüber hinaus wird die enzymatische Desaminierung der trägegebundenen Adenosinacetale mit der monomeren Substrate verglichen.

Synthese und Eigenschaften von O-2',3'-Adenosin- und Inosin-Acetalen mit variablem Alkylidienrest

Die zur Darstellung benötigten Ketoester wurden auf folgendem Weg erhalten: 5-Oxohexansäureethylester aus der Säure in Ethanol mit *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator. Nach azeotropem Schleppen des Reaktionswassers mit Benzol und Destillation an einer Vigreux-Kolonne erhielt man den Ester in 69-prozentiger Ausbeute.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Adenosinacetat mit variablem Alkylidenrest

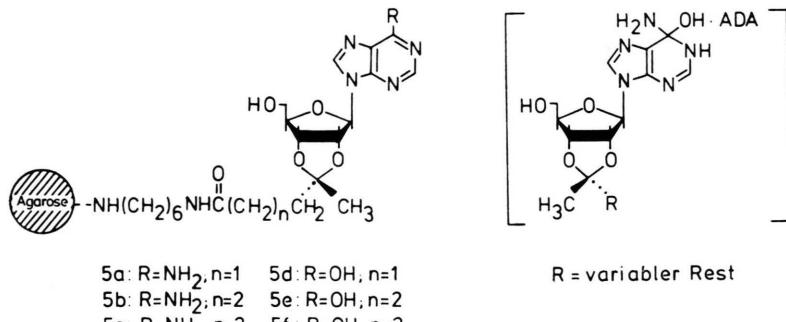
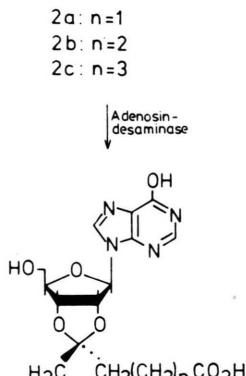
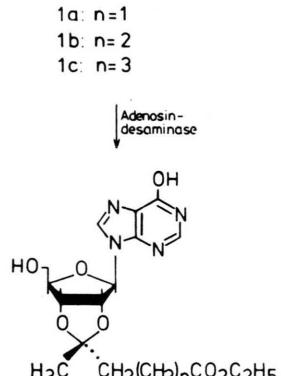
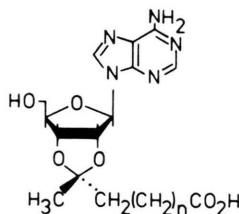
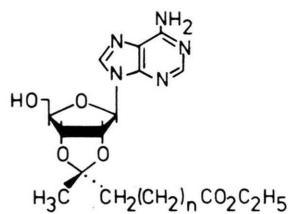
Als Ausgangssubstanz für 6-Oxoheptansäure-ethylester diente 2-Acetyl-cyclopentanon, das nach Säurespaltung aus seiner wässrigen Phase mit Chloroform extrahiert und als Rohprodukt wie 5-Oxohexansäure verestert und aufgearbeitet wurde.

Die Acetalisierung von Adenosin bzw. Inosin mit 5-Oxohexansäure-ethylester bzw. 6-Oxoheptansäure-ethylester gelingt in Dimethylformamid in Gegenwart von Orthoameisensäure-triethylester und Chlorwasserstoff/Dioxan. Die Acetale **1 b/1 c** bzw. **3 b/3 c** fallen zuerst sirupös an, lassen sich aber nach mehrmaligem Abdampfen aus Aceton oder Methanol

kristallisieren. Wie Tabelle I zeigt, erfolgt bei **1 b/1 c** und **3 b/3 c** Acetalisierung an den 2'.3'-Hydroxylgruppen, denn nur die ^{13}C -Signale dieser Kohlenstoffe sind um ca. 10 ppm zu tieferem Feld verschoben. Eine Acetalisierung über die 3'.5'-Hydroxylgruppen, wie sie bei Aldehyden beobachtet wird, unterbleibt.

Durch die Acetalisierung wird auch das ^{13}C -NMR-Signal des Keto-Kohlenstoffatoms von ca. 208 ppm auf 114 ppm signifikant nach höherem Feld verschoben, auf einen Wert, der auch bei **1 a** bzw. **3 a** gefunden wird.

An diesem Kohlenstoffatom wird ein neues chirales Zentrum gebildet. Während jedoch O-2'.3'-Iso-



Tab. I. ^{13}C -Verschiebungen von Adenosin (Ado), O-2'.3'-Isopropylidenadenosin (IpAdo), der Adenosin-Derivate **1 a–c** sowie der Inosin-Derivate **3 a–c** in $[\text{D}_6]$ DMSO; δ -Werte in Werte in ppm relativ zu Tetramethylsilan.

	Nucleobase					Ribofuranosyl-Rest				
	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
Ado	152,5	149,1	119,4	156,2	140,1	88,1	73,6	70,8	86,0	61,8
IpAdo	152,7	148,9	119,2	156,2	139,6	89,8	83,3	81,4	86,4	61,7
1 a	152,6	148,8	119,0	156,1	139,6	89,3	83,3	81,3	86,5	61,4
1 b	152,7	149,0	119,2	156,2	139,7	89,5	83,2	81,2	86,5	61,6
1 c	152,7	148,9	119,2	156,2	139,7	89,5	83,2	81,2	86,5	61,6
3 a	147,7	145,9	124,5	156,5	139,0	89,6	83,9	81,2	86,8	61,3
3 b	147,5	146,0	124,5	156,3	138,7	89,5	83,9	81,1	86,9	61,5
3 c	147,8	146,0	124,4	156,5	138,7	89,5	84,2	81,1	86,8	61,5

Alkyliden-Rest									
α -C	β -C	γ -C	δ -C	C-Acetal	CH ₃ -Acetal	O-CH ₂	CH ₃ -Ester	C=O	
Ado	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IpAdo	27,1	—	—	113,1	25,1	—	—	—	—
1 a	33,4	28,1	—	113,7	23,5	59,8	13,9	172,5	
1 b	33,4	18,9	38,2	—	114,5	23,3	59,7	14,1	172,7
1 c	33,4	22,8	24,6	38,3	114,6	23,3	59,6	14,1	172,4
3 a	33,3	28,1	—	—	113,8	23,4	59,8	13,9	172,5
3 b	33,4	18,9	38,2	—	114,3	23,4	59,6	14,0	172,6
3 c	33,5	22,8	24,6	38,9	114,7	23,4	59,7	14,3	172,8

propylidenadenosin im ^1H -NMR-Spektrum zwei Signale bei 1,35 ppm und 1,65 ppm für die Acetal-Methylengruppen zeigt, tritt bei **1 b**/**1 c**, wie auch schon bei **1 a** [5, 8], im ^1H -NMR-Spectrum nur ein Signal, und zwar um 1,30 ppm, auf, indes kann damit nicht auf die absolute Konfiguration des Acetal-C-Atoms geschlossen werden.

Die Klärung des Problems gelingt durch die Darstellung der Säuren **2 b**/**2 c** bzw. **4 b**/**4 c**. In ethanolischer Natronlauge werden die Ester **1 b**/**1 c** bzw. **3 b**/**3 c** 30 min lang verseift. Neutralisiert wird durch sauren Ionenaustauscher, um nicht schwer abtrennbares Salz zu erzeugen. Mit einigen Tropfen Essigsäure werden **2 b**/**2 c** bzw. **4 b**/**4 c** aus ihren Natriumsalzen freigesetzt; sie fallen in Form farbloser Kristalle aus Wasser analysenrein an und laufen im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel; 0,25 M LiCl) und in der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel; 0,1 M Natriumcitrat, pH 6,5) einheitlich. Sie besitzen im ^{13}C -NMR-Spektrum nur ein Signal um 23 ppm für Acetal-Methylgruppen, was ein Diastereoisomeren-Gemisch ausschließt.

Vom O-2'.3'[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]adenosin (**2 a**), dessen Alkylkette um eine Methylengruppe kürzer als die von **2 b** ist, konnte mittels Röntgenstrukturanalyse [9] die absolute Konfiguration am Acetal-Kohlenstoff von **2 a** mit R festgelegt werden.

Da die ^1H -NMR-Signale der Acetal-Methylgruppen von **2 c** bzw. **4 c** mit dem von **2 a** übereinstimmen, sind auch hier die Methylgruppen *exo*-ständig.

Auf Grund ihrer größeren Lipophilie laufen die Verbindungen **1 c** und **2 c** im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel; 0,25 M LiCl) bzw. in der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel; 0,1 M Natriumcitrat, pH 6,5) langsamer als die entsprechenden Adenosin-Derivate **1 b** und **2 b**.

Enzymatische Desaminierung von O-2'.3'-Ethylidenadenosin-Acetalen

Bei der Desaminierung von Adenosin zu Inosin durch das Enzym Adenosin-Desaminase wird vermutlich die Zwischenstufe (Formel) durchlaufen [10]; dafür ist das Antibiotikum Coformycin [11] ein Beleg, das an C-6 wie der Übergangszustand sp^3 -hybridisiert ist und viel stärker als Adenosin an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird.

Strukturelle Änderungen an den 2'/3'-Hydroxylgruppen haben einen geringeren Einfluß auf die Desaminierungs geschwindigkeit als solche an der Nucleobase. So zeigt die Reaktion des Enzyms mit O-2'.3'-Isopropylidenadenosin immerhin noch ca. 50% des V_{\max} -Wertes von Adenosin, während z. B. N⁶.N⁶-Dimethyladenosin als Inhibitor wirkt [12].

Für die Synthese von Affinitätsharzen, die Nucleoside als Liganden besitzen und die für Adenosin-Desaminase, ein Enzym mit der Molmasse von 35 000 Dalton [13], spezifisch sind, ist von Interesse, welchen Einfluß der zwischen polymere Matrix und den Liganden eingefügte Spacer auf die Bindungsstärke zwischen Enzym und Substrat hat. Die Ester **1 a–c** gestatten es nun, den Einfluß der Kettenlänge des Spacer-Arms auf die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym näher zu studieren. Darüber hinaus ist mit den Säuren **2 a–c** nachprüfbar, ob durch den Ersatz von hydrophoben Ethoxy-carbonylgruppen durch ionisierende Carboxylgruppen die Desaminierungsgeschwindigkeit und damit die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat verstärkt oder abgeschwächt wird.

Zum qualitativen Test der Desaminierbarkeit werden zu Lösungen von **1 a–c**, bzw. **2 a–c** und in Sörensen-Puffer jeweils 5 enzymatische Einheiten (units) Adenosin-Desaminase in 5 µl Glycerin gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C vergleicht man die Lösungen dünnenschichtchromatographisch (Kieselgel; 0,25 M LiCl); alle Adenosinacetale haben sich dabei zu den entsprechenden Inosinverbindungen **3 a–c** bzw. **4 a–c** umgesetzt.

Zur quantitativen Untersuchung der Desaminierungsgeschwindigkeit werden jeweils 1,18 A_{260} -Einheiten der Ester **1 a–c** oder der Säuren **2 a–c**,

sowie als Vergleichssubstanzen Adenosin und O-2'-3'-Isopropylidenadenosin in je 1 ml Sörensen-Puffer gelöst und mit je 0,05 Units Adenosin-Desaminase in 5 µl Sörensen-Puffer versetzt. In 1 cm-Quarzküvetten wird bei 260 nm die Abnahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt [14].

Die Kurven (Abb. 1 a, b) zeigen die Zunahme der Desaminierungsgeschwindigkeit mit zunehmender Zahl von Methylengruppen im Alkyliden-Rest an, wenn auch die Geschwindigkeit des Adenosins nicht erreicht wird. Ein ähnlicher Gang zeigt sich auch bei den Inosin-Acetalen, wenn diese als Inhibitoren bei der Desaminierungsreaktion von Adenosin zugesetzt werden.

Bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von Substrat zu Inhibitor wie 1:10 vermindert **4 a** die Steigung der Anfangsgeschwindigkeit auf 71%, **4 b**/ **4 c** auf 60%.

Diese Befunde zeigen, daß ein hydrophober O-2'-3'-Alkyliden-Rest mit zunehmender Kettenlänge die Desaminierungsgeschwindigkeit von Substraten erhöhen kann, was vermuten läßt, daß im oder am aktiven Zentrum von Adenosin-Desaminase eine Häufung hydrophober Gruppen auftritt. Dies wird auch dadurch gestützt, daß hydrophile Gruppen, wie die Carboxylat-Reste in **2 a–c** die Desaminierungsrate vermindern.

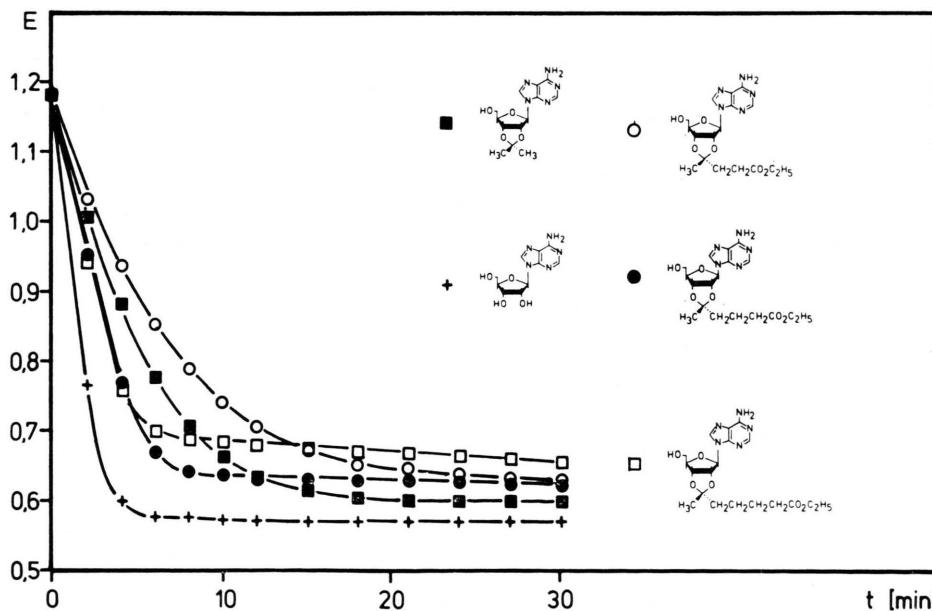


Abb. 1 a. Zeitabhängige Abnahme der 260-nm-Extinktion von Adenosin (+), O-2',3'-Isopropyliden (■), sowie der Adenosin-Derivate **1 a** (○), **1 b** (●) und **1 c** (□) in 0,15 M Sörensen-Puffer bei 25 °C, 0,05 Units Adenosin-Desaminase/ml.

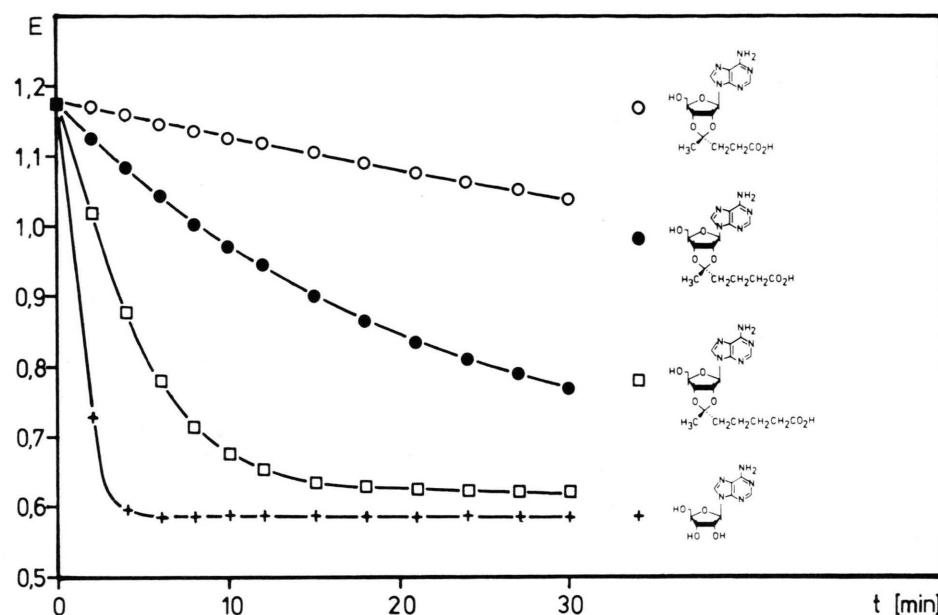


Abb. 1 b. Zeitabhängige Abnahme der 260-nm-Extinktion von Adenosin (+), 2 a (○), 2 b (●) und 2 c (□) in 0,15 M Sörensen-Puffer bei 25 °C, 0,05 Units Adenosin-Desaminase/ml.

Qualitativ vergleichbare Befunde erhält man auch, wenn man die enzymatische Desaminierung der trägegebundenen Adenosin-Acetale **5 a—c** vergleicht. Zu diesem Zweck werden 0,5 mm Küvetten mit den Polymeren **5 a**, **5 b** oder **5 c** in dichtester Packung gefüllt und mit 5 µl ($2,5 \times 10^{-2}$ units) Adenosin-Desaminase versetzt und bei 260 nm der Extinktionsabfall beobachtet. Während bei **5 a** innerhalb von 1 h keine Umsetzung zu beobachten war, hatten sich **5 b/5 c** quantitativ zu **5 e/5 f** umgesetzt (Extinktionsabfall ca. 50%). Die Anfangssteigungen der Umsetzungsgeschwindigkeiten verhielten sich von **5 b** zu **5 c** wie 3 zu 5 (Tabelle II). Das Acetal mit längster Methylenkette zeigte im immobilisierten Zustand wie auch schon als Monomer die größte Desaminierungsgeschwindigkeit.

Die an den Polymeren **5 a—c** gewonnenen Zusammenhänge zwischen Alkylidenkettenlänge des Spacer-Restes in der Nähe des Substrat-Liganden und der Desaminierungsgeschwindigkeit sind denen an den Monomeren **1 a—c** bzw. **2 a—c** vergleichbar. Die enzymatische Umsetzung derart modifizierter

Substrate, die Strukturelemente des späteren Spacer-Restes enthalten, kann deshalb bessere Aufschlüsse über die Biospezifität eines Affinitätsharzes als das eigentliche Substrat geben.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Berlin-Schmelzpunktapparat (Wagner & Munz, München, Deutschland) bestimmt und sind nicht korrigiert.

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Bruker HX-60 Spektrometer, δ -Werte in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS).

UV-Spektren: Zeiss PMQ 3 oder Shimadzu UV-200 Spektrometer, Lösungsmittel Methanol (MeOH).

Die Mikroanalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller (Göttingen, Deutschland) ausgeführt.

Zur Dünnschichtelektrophorese wurde eine TLE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg, Deutschland) benutzt, die mit einem Lauda-Thermostaten auf ca. 1 °C gekühlt wurde. Zur Dünnschichtchromatogra-

Tab. II. Extinktionsdifferenzen ($\Delta E/\text{min}$; 260 nm) der Anfangsgeschwindigkeiten (linearer Bereich) der enzymatischen Desaminierung von **1 a—c**, **2 a—c** und **5 a—c** bei konstanter Menge von Adenosin-Desaminase ($2,5 \times 10^{-2}$ units).

	1 a 0,08 mM	1 b 0,08 mM	1 c 0,08 mM	2 a 0,08 mM	2 b 0,08 mM	2 c 0,08 mM	5 a 10 mM	5 b 4 mM	5 c 4 mM
$\Delta E \times 10^{-3}$ min	69	108	114	4	23	71	0	3	5

phie (DC) und Dünnschichtelektrophorese (DE) wurden Kieselgel F 254 Platten (Woelm, Eschwege, Deutschland) verwendet. Laufmittelsysteme für DC und DE: (A) 0,25 M LiCl; (B) 0,1 M Natriumcitrat, pH 6,5.

O-2'.3'-[1-(2-Ethoxycarbonylethyl)ethyleniden]adenosin (**1a**) und *O*-2'.3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyleniden]adenosin (**2a**) wurden nach Seela und Cramer [5], *O*-2'.3'-[1-(2-Ethoxycarbonylethyl)ethyleniden]inosin (**3a**) und *O*-2'.3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyleniden]inosin (**4a**) nach Rosemeyer und Seela [8] dargestellt.

6-Aminohexyl agarose (AH Sepharose 4B) wurde von der Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Adenosin-Desaminase aus Kälberdarm, E.C. 3.5.4.4.; (5 mg/ml Glycerin, 1 mg = 200 units; 1 unit desaminiert 1 µmol Adenosin/min) lieferte die Fa. Boehringer (Mannheim, Deutschland), die Nucleoside die Fa. Pharma Waldhof (Düsseldorf, Deutschland).

5-Oxohexansäure-ethylester

20 g (154 mmol) 5-Oxohexansäure werden mit 20 ml (343 mmol) Ethanol, 1 g *p*-Toluolsulfonsäurehydrat und 100 ml Benzol am Wasserabscheider 4 h verestert und über eine 20 cm Vigreux-Kolonne im Wasserstrahlvakuum fraktioniert. 16,8 g (69,0%) farblose Flüssigkeit vom Sdp. 110–115 °C/12 Torr (Lit. [15]: Sdp. 110–115 °C/12 Torr), $n_D^{23} = 1,4265$.

¹³C-NMR ([D₆]DMSO): δ = 207,75 (C-5), 172,58 (C-1), 59,71 (O—CH₂), 41,12 (C-2), 32,77 (C-4), 29,59 (C-6), 18,72 (C-3), 14,12 ppm (CH₃-Ester).

6-Oxoheptansäure-ethylester

12,5 g (0,10 mol) 2-Acetyl-cyclopentanon werden 1 h mit 100 ml 5-proz. Natronlauge unter Rückfluß gekocht, in 300 ml Wasser gegossen, unumgesetztes Keton mit Ether ausgeschüttelt und die angesäuerte wässrige Phase mit Chloroform extrahiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird wie bei der 5-Oxohexansäure verestert und aufgearbeitet. 7,5 g (43,9%) farblose Flüssigkeit vom Sdp. 117–122 °C/14 Torr und $n_D^{25} = 1,4306$ (Lit. [16]: $n_D^{25} = 1,4305$).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO): δ = 208,07 (C-6), 172,78 (C-1), 59,64 (O—CH₂), 42,41 (C-5), 33,42 (C-2), 29,59 (C-7), 24,09 (C-4), 22,75 (C-3), 14,12 ppm (CH₃-Ester).

O-2'.3'-[1-(3-Ethoxycarbonylpropyl)ethyleniden]adenosin (**1b**)

3,0 g (11,3 mmol) Adenosin werden unter Rühren in 35 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid suspendiert und nach Zugabe von 3 ml (22,6 mmol) 5-Oxohexansäure-ethylester und 2,5 ml Orthoameisensäure-triethylester durch 5 ml 7 M Chlorwasserstoff in Dioxan in Lösung gebracht. Nach 24 h Aufbewahren bei Raumtemperatur wird in 500 ml trockenen Ether gegossen und der ölige Rückstand zweimal mit Ether gewaschen. Die durch Zusatz von 2-proz. wässrigem Natriumhydrogencarbonat in Chloroform gelöste Substanz wird mit Wasser gegen geschüttelt, getrocknet und die organische Phase abgedampft. Der glasige Abdampfrückstand wird in Aceton aufgenommen, durch Einengen erhält man 3,7 g (80,8%) farblose Nadeln (Aceton) vom Schmp. 120 °C.

DC (A): $R_F = 0,16$; DE (B): $R_E(\text{Adenosin}) = 0,44$ (–).

UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14\,700$).

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,33 (s; 2-H), 8,13 (s; 8-H), 7,32 (s; 6-NH₂), 6,13 (d; 1'-H), 5,40 (q; 2'-H), 4,98 (q; 3'-H), um 4,2 (m; 4'-H), 4,02 (q; O—CH₂), um 3,5 (m; 5'-H), um 2,4 (m; α -CH₂), um 1,7 (m; 2 × CH₂), 1,30 (s; Acetal-CH₃), 1,20 ppm (t; Ester-CH₃).

¹³C-NMR: s. Tabelle.

C₁₈H₂₅N₅O₆ (407,43)

Ber.	C 53,06	H 6,19	N 17,19
Gef.	C 52,83	H 6,14	N 17,01

O-2'.3'-[1-(3-Ethoxycarbonylpropyl)ethyleniden]inosin (**3b**)

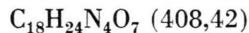
10,73 g (40 mmol) Inosin werden wie bei **1b** mit 8,8 g (80 mmol) 6-Oxohexansäure-ethylester umgesetzt und aufgearbeitet. 4,84 g **3b** (30%) (Methanol) vom Schmp. 214–216 °C.

DC (A): $R_F = 0,1$.

UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11\,300$).

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,28 (s; 2-H), 8,06 (s; 8-H), 6,10 (d; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 1'-H), 5,32 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 2'-H), 4,83 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 3'-H), 4,18 (m; 4'-H), 4,00 (q; CH₂-Ester), 3,52 (m; 5'-CH₂), um 2,5 und 1,77 (m; aliphatisches CH₂), 1,31 (s; CH₃-Acetal), 1,19 ppm (t; CH₃-Ester).

¹³C-NMR: s. Tabelle.



Ber.	C 52,93	H 5,92	N 13,72
Gef.	C 52,83	H 6,04	N 13,70

O-2'.3'-[1-(3-Carboxypropyl)ethylen]adenosin (2 b)

500 mg (1,2 mmol) **1 b** werden in 30 ml Ethanol/1 N Natronlauge (1 : 1) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch Zusatz von Ionenaustauscher Amberlite IR-120 (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 wenig Wasser aufgenommen und die Substanz durch Versetzen mit einigen Tropfen 1 M Essigsäure auskristallisiert. 200 mg (43,0%) farblose Plättchen (Wasser) vom Schmp. 194 °C.

DC (A) : $R_F = 0,29$; DE (B) : $R_{E(\text{Adenosin})} = 0,67$ (+).

UV(MeOH) : $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14\,300$).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D₆]DMSO) : $\delta = 174,40$ (C = 0), 156,12 (C-6), 152,64 (C-2), 148,88 (C-4), 139,75 (C-8), 119,61 (C-5), 114,49 (C-Acetal), 89,56 (C-1'), 86,71 (C-4'), 83,34 (C-2'), 81,27 (C-3'), 61,59 (C-5'), 38,14 (γ -C), 33,55 (α -C), 23,44 (CH₃-Acetal), 18,91 ppm (β -C).



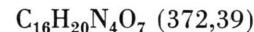
Ber.	C 50,66	H 5,58	N 18,46
Gef.	C 50,81	H 5,54	N 18,40

O-2'.3'-[1-(3-Carboxypropyl)ethyliden]inosin (4 b)

Alkalische Hydrolyse von 1,0 g (2,5 mmol) **3 b** unter **2 b**-Bedingungen liefert 825 mg (89%) farbloses **4 b** (Wasser) vom Schmp. 164 – 166 °C.

DC(H₂O) : $R_F = 0,61$; Inosin 0,84.

UV(MeOH) : $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11\,200$).



Ber.	C 50,52	H 5,30	N 14,73
Gef.	C 50,50	H 5,45	N 14,60

O-2'.3'-[1-(4-Ethoxycarbonylbutyl)ethyliden]adenosin (1 c)

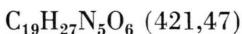
3,0 g (11,3 mmol) Adenosin werden wie bei **1 b** mit 6-Oxoheptansäureethylester acetalisiert und aufgearbeitet. 4,4 g (92,4%) farblose Nadeln (Aceton) vom Schmp. 144 °C.

DC(A) : $R_F = 0,17$; DE(B) : $R_{E(\text{Adenosin})} = 0,00$.

UV(MeOH) : $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 15\,000$).

$^1\text{H-NMR}$ ([D₆]DMSO) : $\delta = 8,33$ (s; 2-H), 8,15 (s; 8-H), 7,32 (s; NH₂), 6,13 (d; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 1'-H), 5,4 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 2'-H), 4,98 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 3'-H), 4,3 (m; 4'-H), 4,1 (m; OCH₂), 3,5 (5'-H), um 2,3 und 1,55 (m; aliphatisches CH₂), 1,3 (CH₃-Acetal), 1,18 ppm (CH₃-Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$: s. Tabelle.



Ber.	C 54,15	H 6,46	N 16,62
Gef.	C 54,36	H 6,40	N 16,62

O-2'.3'-[1-(4-Ethoxycarbonylbutyl)ethyliden]inosin (3 c)

10,73 g (40 mmol) Inosin werden wie bei **1 b** mit 6-Oxoheptansäureethylester acetalisiert und aufgearbeitet. 11,5 g (68%) kristallines **3 c** (Methanol) vom Schmp. 213 – 216 °C.

DC(CHCl₃/MeOH, 9 : 1) : $R_F = 0,60$.

UV(MeOH) : $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10\,700$).

$^1\text{H-NMR}$ ([D₆]DMSO) : $\delta = 8,30$ (s; 4-H), 8,1 (s; 8-H), 6,08 (d; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 1'-H), 5,3 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 2'-H), 4,95 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 3'-H), 4,20 (m; 4-H), 4,0 (m; CH₂-Ester), 3,5 (d; 5'-CH₂; $J = 5 \text{ Hz}$), um 2,2 und 1,65 (m; aliphatisches CH₂), 1,30 (s; CH₃-Acetal), 1,15 ppm (t; CH₃-Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$: s. Tabelle.



Ber.	C 54,02	H 6,30	N 13,26
Gef.	C 54,03	H 6,48	N 13,33

O-2'.3'-[1-(4-Carboxybutyl)ethyliden]adenosin (2 c)

Alkalische Hydrolyse von 2,0 g (4,7 mmol) **1 c** unter **2 b**-Bedingungen liefert 570 mg (30,5%) farblose Nadeln (Wasser) vom Schmp. 194 °C.

DC(A) : $R_F = 0,31$; DE(B) : $R_{E(\text{Adenosin})} = 0,50$ (+).

UV(MeOH) : $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 15\,600$).

$^1\text{H-NMR}$ ([D₆]DMSO) : $\delta = 8,33$ (s; 2-H), 8,15 (s; 8-H), 7,32 (s; NH₂), 6,13 (d; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 1'-H), 5,4 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 2'-H), 5,0 (q; $J = 2,5 \text{ Hz}$, 3'-H), 4,23 (m; 4'-H), 3,54 (d; $J = 5 \text{ Hz}$, 5'-H), um 2,3 und 1,6 (m; aliphatisches CH₂), 1,30 ppm (s; CH₃-Acetal).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO): $\delta = 174,80$ (C = 0), 156,13 (C-6), 152,64 (C-2), 148,88 (C-4), 139,68 (C-8), 119,03 (C-5), 114,62 (C-Acetal), 89,50 (C-1'), 86,52 (C-4'), 83,15 (C-2'), 81,14 (C-3'), 61,59 (C-5'), 38,75 (δ -C), 33,61 (α -C), 24,34 (γ -C), 23,31 (CH₃-Acetal), 22,86 ppm (β -C).



Ber.	C 51,90	H 5,89	N 17,81
Gef.	C 52,00	H 6,17	N 17,94

O-2'.3'-(1-(4-Carboxybutyl)ethyliden)inosin (4 c)

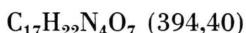
3,0 g (7,1 mmol) **3 c** werden wie **2 b** umgesetzt und aufgearbeitet. 1,7 g (61%) kristallines **4 c** (Wasser) vom Schmp. 162 bis 164 °C.

DC(A) : $R_F = 0,44$.

UV(MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 245$ nm ($\varepsilon = 10\,100$).

¹H-NMR ([D₆]DMSO) : $\delta = 8,29$ (s; 4-H), 8,08 (s; 8-H), 6,10 (d; $J = 2,5$ Hz, 1'-H), 5,32 (q; $J = 2,5$ Hz, 2'-H), 4,96 (q; $J = 2,5$ Hz, 3'-H), 4,18 (m; 4'-H), 3,53 (d; $J = 5$ Hz, 5'-CH₂), 2,22 und 1,55 (m; aliphatisches CH₂), 1,30 ppm (s; CH₃-Acetal).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO) : $\delta = 172,8$ (C = 0), 156,6 (C-6), 147,8 (C-2), 146,1 (C-4), 138,8 (C-8), 124,4 (C-5), 114,6 (C-Acetal), 89,5 (C-1'), 86,8 (C-4'), 84,1 (C-2'), 81,1 (C-3'), 61,4 (C-5'), 59,5 (O-CH₂), 38,9 (δ -C), 33,4 (α -C), 24,5 (γ -C), 23,5 (CH₃-Acetal), 22,7 ppm (β -C).



Ber.	C 51,90	H 5,89	N 17,80
Gef.	C 52,00	H 5,95	N 17,89

Kupplung der Acetale **2 a–c** mit 6-Aminohexyl-agarose zu den Polymeren **5 a–c**

400 mg der Acetale **2 a**, **2 b** oder **2 c** in 20 ml Wasser/Dioxan (2 : 1) werden mit 20 ml feuchtem 6-Aminohexyl-agarose-Gel und 500 mg (2,69 mmol) N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid versetzt. Man schüttelt über Nacht bei Raumtemperatur, filtriert und wäscht mit je 250 ml Wasser/Dioxan (2 : 1), 0,1 M wässrigem Natriumhydrogencarbonat, 0,01 M Salzsäure, 0,5 M wässrigem Natriumchlorid und Wasser. Man erhält jeweils 20 ml farbloses Agarose-Derivat **5 a–c**.

Ligandenkonzentrationen

Gleiche Mengen der Gele **5 a–c** sowie AH-Sephadex 4 B (Blindwert) und einer definierten Menge der Acetale **2 a–c** in je 5 ml 1 N Salzsäure werden bei 100 °C 15 min hydrolysiert. Anschließend werden die Extinktionen bei 260 nm in 1 cm-Quarzküvetten bestimmt. Durch Differenzbildung aus $E_{\text{Gel}} - E_{\text{AH-Agarose}}$ und Vergleich mit der Extinktion des jeweiligen Ligandenhydrolysats erhält man für **5 a**: 10,35 $\mu\text{mol/g}$, **5 b**: 4,18 $\mu\text{mol/g}$ und **5 c**: 4,10 $\mu\text{mol/g}$.

Enzymatische Desaminierung von Adenosin und O-2'.3'-Ethylidenadenosin-Derivaten mit Adenosin-Desaminase

Je 1,18 A_{260} -Einheiten von Adenosin, O-2'.3'-Isopropylidenadenosin, **1 a**, **1 b**, **c1**, **2 a**, **2 b** oder **2 c** in je 1000 μl Sörensen-Puffer (pH 7,6) werden in 1-cm-Quarzküvetten mit je 0,05 Units Adenosin-Desaminase in 5 μl Sörensen-Puffer (pH 7,6) versetzt. Die Abnahme der Extinktion wird in Abhängigkeit von der Zeit bei 260 nm gemessen (Abb. 1 a, b).

Inhibition der enzymatischen Desaminierung durch die Inosin-Acetale **4 a–c**

Jeweils 100 μl einer Adenosin-Stammlösung, die 0,1 μmol Adenosin enthält, wird entweder direkt mit Sörensen-Puffer (pH 7,6) auf 1 ml aufgefüllt oder nach Zusatz von 100 μl einer Inhibitor-Stammlösung, die 1 μmol der Acetale **4 a**, **4 b** oder **4 c** enthält, auf 1 ml verdünnt. Man versetzt mit $2,5 \times 10^{-2}$ units (5 μl) Adenosin-Desaminase in Phosphat-Puffer pH 7,6 und verfolgt die Abnahme von E_{260} in einer 1 cm-Quarzküvette. Die negative Steigung des linearen Bereichs (1. bis 2. Minute) der Messung ohne Inhibitor wird gleich 100% gesetzt. Die Anfangssteigungen der Kurven mit Inhibitor betragen, bezogen auf Adenosin (100%), bei **4 a** 71%, **4 b** 58% und **4 c** 60%.

Enzymatische Desaminierung der Polymere **5 a–c**

Eine 0,5 ml-Quarzküvette (Helma, 170 μl Inhalt) wird mit einer Suspension der Polymere **5 a**, **5 b** oder **5 c** in 0,15 M Sörensen-Puffer (pH 7,6) gefüllt

und mit $2,5 \times 10^{-2}$ units (5 μl) Adenosin-Desaminase versetzt. Nach dem Absitzen des Gels ($3/4$ Füllhöhe) wird zwischen der 10. und 60. Minute der Extinktionsabfall bei 260 nm bestimmt und die Steigungen der linearen Bereiche miteinander verglichen (Tab. II).

Herrn B. Seeger danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren und Fr. Doris Hasselmann für experimentelle Unterstützung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie wird für die Förderung des Vorhabens gedankt.

- [1] I. Parikh, S. March u. P. Cuatrecasas, Methods Enzymol. **34**, 77 (1974).
- [2] C. R. Lowe u. P. D. G. Dean, Affinity Chromatography, Wiley, London 1974.
- [3] H. P. Jennissen, Biochemistry **15**, 5683 (1976).
- [4] M. Wilchek u. C. S. Hexter, Methods Biochem. Anal. **23**, 347 (1976).
- [5] F. Seela u. F. Cramer, Chem. Ber. **108**, 1329 (1975).
- [6] F. Seela u. S. Waldeck, Nucleic Acids Res. **2**, 2343 (1975).
- [7] F. Seela u. H. Rosemeyer, Z. Naturforsch. **33 c**, 56 (1978).
- [8] H. Rosemeyer u. F. Seela, Carbohydrate Res. **62**, 155 (1978).
- [9] D. Adamiak, M. Noltemeyer, W. Sänger u. F. Seela, Z. Naturforsch. **33 c**, 169 (1978).
- [10] B. Evans u. R. Wolfenden, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 4751 (1970).
- [11] R. Wolfenden, D. F. Wentworth u. G. N. Mitchell, Biochemistry **16**, 5071 (1977).
- [12] B. M. Chassey u. R. H. Suhadolnik, J. Biol. Chem. **242**, 3655 (1967).
- [13] P. Andrews, Biochem. J. **96**, 595 (1965).
- [14] H. Kalckar, J. Biol. Chem. **167**, 445 (1947).
- [15] L. Ruzicka, Helv. Chim. Acta **2**, 144 (1919).
- [16] R. Kuhn, F. Köhler u. L. Köhler, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **242**, 194 (1936).