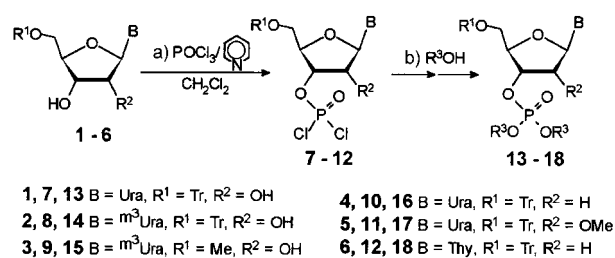


Lösungsmittelkontrollierte intramolekulare Katalyse bei der direkten Synthese von 5'-O-geschützten Ribonucleosid-2'- und 3'-Dialkylphosphaten**

Christo D. Roussev,* Gabriela D. Ivanova, Emilia K. Bratovanova und Dimitar D. Petkov

Rasche Entwicklungen in der Kristallographie, der Enzymologie und der Chemie haben in den letzten Jahren erheblich zum Verständnis der Mechanismen von Enzymwirkungen beigetragen. Mit der Einführung von Substratmimetika^[1] stand ein wirkungsvolles Mittel zur Verfügung, um die mechanistischen Aspekte von RNA- und Enzymkatalyse aufzuklären. Modellreaktionen in aprotischen organischen Lösungsmitteln sollen die Umgebung der aktiven Zentren genau nachahmen, die wenig oder kein Wasser enthalten und an denen eine intramolekulare Katalyse begünstigt wäre. In aprotischen Medien sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Reagens und dem Lösungsmittel nur schwach oder fehlen ganz, sodass die Katalysator- oder Inhibitorwirkungen von Wasserstoffbrückenbindungsdonoren und -acceptoren auf die Reaktionsgeschwindigkeiten untersucht werden können. Arbeiten über Struktur-Wirkungs-Beziehungen und Lösungsmittelleffekte haben gezeigt, dass die Reaktionsmechanismen durch andere Substituenten an den Reaktanten und/oder andere Reaktionsmedien drastisch geändert werden können.^[2]

Wir berichten hier über die erste lösungsmittelinduzierte, intramolekulare elektrophile Katalyse durch eine *cis*-vicinale Hydroxygruppe. Bei der Synthese der 5'-O-geschützten Ribonucleosid-2'- und 3'-Dialkylphosphate **13–15** ist die Phosphatübertragungsreaktion gegenüber der entsprechenden 2'-Desoxy- und 2'-O-geschützten Derivate **16–18** beschleunigt (siehe Schema 1 und Tabelle 1; die Verbindun-



Schema 1. Zweistufige Synthese der 5'-O-geschützten Ribonucleoside. Die Verbindungen **7–9** und **13–15** entstanden als Isomerengemische der 2'- und 3'-Derivate im Verhältnis ca. 65:35; der Einfachheit halber sind die 2'-Derivate nicht gezeigt. Ura = Uridin, Tr = Triphenylmethyl, Thy = Thymin.

[*] Dr. C. D. Roussev, G. D. Ivanova, Dr. E. K. Bratovanova, Prof. Dr. D. D. Petkov
 Laboratory of Biocatalysis
 Institute of Organic Chemistry
 Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia (Bulgarien)
 Fax: (+359) 2-700-225
 E-mail: christo@orgchem.bas.bg

[**] Diese Arbeit wurde vom bulgarischen Nationalfonds zur Förderung der Forschung unterstützt. Wir danken Dr. V. Yomtova für hilfreiche Diskussionen und Dr. N. Vassilev von der NMR-Abteilung für seine Unterstützung.

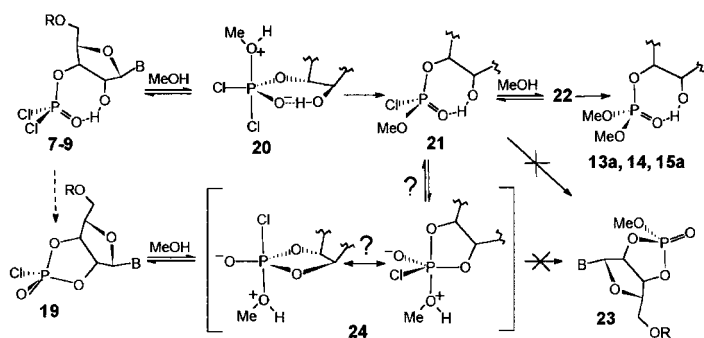
Tabelle 1. Halbwertszeiten ($\tau_{1/2}$) als Maß für die Beschleunigung des Phosphattransfers bei der Synthese von 5'-O-Ribonucleosiden.

Produkt	R ³ OH (siehe Schema 1)	Ausb. [%]	$\tau_{1/2}$ [min] ^[a]
13a	CH ₃ OH	77	5.5
13b	CH ₃ CH ₂ OH	68	12
14	CH ₃ OH	79	7.5
15a	CH ₃ OH	73	6.5
15b	Ph(CH ₃) ₃ OH	69	14.5
16	CH ₃ OH	98	267
17	CH ₃ OH	96	290
18	CH ₃ OH	97	261

[a] $\tau_{1/2}$ wurde nach Zugabe von R³OH im zweiten Reaktionsschritt gemessen (Schema 1).

gen **13–15** entstanden als Gemische der 2'- und 3'-Isomere, gezeigt sind aber nur die 3'-Derivate). Bei den beschleunigten Reaktionen steuert eine mittelstarke selektive Mikrosolvatation die Beteiligung der benachbarten Hydroxygruppe (2'-OH oder 3'-OH) und verhindert den üblichen entropiebegünstigten Angriff des internen Nucleophils. Dies fördert die externe Substitution am Phosphoratom und führt zu unterschiedlichen Phosphoryltransfer-Mechanismen in wässrigen und organischen Medien. Wenn das Lösungsmittelverhalten der aktiven Zentren der Enzyme durch nichtwässrige Lösungsmittel besser nachgeahmt wird,^[3] können die Ergebnisse wichtige Informationen liefern, z.B. über die mögliche Rolle der intramolekularen Katalyse bei enzymatischen Reaktionen. Das Verfahren ist außerdem eine rasche, einfache und kostengünstige Synthesemethode für die Ribonucleosid-2'- und 3'-dialkylphosphate **13–15**. Diese Verbindungen könnten verwendet werden, um die neutrale Ionenform von RNA^[4,5] in Modellreaktion nachzuahmen.

Die Triester **13–18** wurden in zwei Stufen synthetisiert (Schema 1). Im ersten Schritt wurden die 5'-O-geschützten Nucleoside **1–6** mit POCl₃/Pyridin in wasserfreiem CH₂Cl₂ phosphoryliert (siehe Experimentelles); die Umsetzung war laut Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) und ³¹P-NMR-Spektrum innerhalb von fünf Minuten beendet – der zur Aufnahme des ersten ³¹P-NMR-Spektrums erforderlichen Zeit. Die zweite Stufe der Reaktion bestand in der Alkoholyse der gebildeten 5'-O-geschützten Nucleosid-phosphodichloridate **7–12** mit R³OH. Diese Umsetzung verlief mit den Verbindungen **7–9** in nur 20–40 Minuten, dauerte aber bei den 2'-Desoxyderivaten **10** und **12**^[4–7] und dem 2'-O-Methylether **11**^[8] mehrere Stunden. Da das cyclische Monochloridat **19**, der cyclische Triester **23** (Schema 2) oder die möglichen diphosphorylierten Nebenprodukte in den ³¹P-NMR-Spektren nur in geringen Mengen nachgewiesen wurden, nahmen wir an, dass die freie *cis*-vicinale Hydroxygruppe die beiden aufeinander folgenden Alkoholysen der Ribonucleosiddichlorphosphate **7–9** beschleunigt. Unsere Interpretation lässt sich mit einer intramolekularen, vom aprotischen Lösungsmittel durch allgemeine Säurekatalyse induzierten Wasserstoffbrückenbindung der benachbarten Hydroxygruppe erklären, die eine externe Alkoholyse der Verbindungen **7–9** und **21** und/oder der pentakoordinierten Phosphoranzwischen- oder Übergangsstufen **20** und **22** fördert (die Struktur von **22** entspricht der von **20** nach Substitution eines der beiden Chloratome durch die Methoxygruppe).



Schema 2. Vorgeschlagene Mechanismen zur Bildung der 5'-O-Ribonucleosidderivate. Nach Westheimer sollte der nucleophile Angriff auf **19** zuerst zu den Verbindungen **24** führen, die sehr energiereich sein sollten.

In neutraler wässriger Lösung und unter physiologischen Bedingungen bewirkt die nucleophile Unterstützung durch die 2'-Hydroxygruppe die rasche Hydrolyse von RNA.^[9,10] Wir möchten hier den Unterschied zwischen diesem Mechanismus mit nucleophiler Beteiligung der vicinalen Hydroxygruppe und dem von uns vorgeschlagenen Mechanismus hervorheben, bei dem die Hydroxygruppe einen Ester durch intramolekulare allgemeine Säurekatalyse aktiviert. In polaren Solventien wie Wasser, die als Wasserstoffbrückenbindungsdonoren wirken können, werden der Wasserstoffbrückenbindungsacceptor (der Phosphatrest) und der intramolekulare Donor (die benachbarte OH-Gruppe) getrennt solvatisiert. Dadurch verhindert ein solches Lösungsmittel die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung, und der interne nucleophile Angriff des Phosphoratoms durch die benachbarte Hydroxygruppe ist die einzig mögliche Reaktion. Dagegen kann die freie vicinale Hydroxygruppe, wie bereits gesagt, in unpolaren aprotischen organischen Lösungsmitteln als ein Wasserstoffbrückenbindungsdonor eine Säurekatalyse bewirken.^[11,12]

Im Verlauf der Substitutionsreaktion könnte der durch Wasserstoffbrückenbindung gebildete sechsgliedrige Ring eine diäquatoriale Position einnehmen, und die Protonierung des ehemaligen Phosphoryl-Sauerstoffatoms würde die Zwischenstufe (oder den Übergangszustand) **20** stabilisieren. Dadurch würde die externe Alkoholyse der Ribonucleosid-3'(und/oder 2')-di/monochlorphosphate **7–9** und **21** unterstützt. Diese selektive Mikrosolvatation durch die benachbarte Hydroxygruppe in aprotischen Solventien liegt auch dem Henbest-Kupcham-Effekt zugrunde, durch den Acyltransferreaktionen signifikant verbessert werden.^[13] Ein Beispiel hierfür ist die Aminolyse von 2-Hydroxyphenylbenzoat in Acetonitril verglichen mit der von 2-Methoxyphenylbenzoat.^[14]

Um zu beweisen, dass die Derivate **7–9** entscheidende Zwischenstufen sind, untersuchten wir die Reaktionen durch ³¹P-NMR-Spektroskopie. Wir beobachteten den ersten und zweiten Reaktionsschritt der Umsetzung von 5'-O-Trityluridin **1** mit MeOH als Alkohol gegenüber denen von 5'-O-Trityl-2'-desoxyuridin **4** und 5'-O-Trityl-2'-methoxyuridin **5** (Schema 1). Für den ersten Schritt zeigten die Signale von **7** (3': $\delta_P = 22.4$, d, $^3J_{PH} = 12$ Hz; 2': $\delta_P = 20.03$, d, $^3J_{PH} = 10$ Hz; Verhältnis ca. 65:35), **10** ($\delta_P = 6.7$, d, $^3J_{PH} = 11$ Hz) und **11** ($\delta_P = 8.4$, d, $^3J_{PH} = 10$ Hz) fünf Minuten nach Beginn der

Reaktion eine quantitative Umsetzung an. Die Multiplizität dieser Signale im ³¹P-¹H-Kopplungsspektrum und die Kopplungskonstanten $^3J_{PH}$ von **7**, **10** und **11** sind ähnlich und sprechen, in Verbindung mit der gegenüber **10** und **11** größeren Tieffeldverschiebung von **7** ($\Delta\delta_P = 15.7$ und **11**), nachdrücklich für die vorgeschlagene Struktur von **7** (Schema 2) mit einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung. Diese Interpretation wird auch durch das Vorliegen einer schwachen Wasserstoffbrückenbindung im Grundzustand des Triesterprodukts **13a** gestützt, die im ¹H-NMR-Spektrum zu einer relativ geringen Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta_H = 1.66$) des Protonensignals der 2'(3')-Hydroxygruppe führte.

Die Cyclisierung ist allerdings nicht völlig ausgeschlossen. Die dem cyclischen Monochloridat **19** zugeordnete Resonanz ($\delta_P = 20.01$, t, $^3J_{PH} = 9.2$ und 8.4 Hz)^[15] erscheint trotz der Chiralität am Phosphoratom als ein Signal. Seine Intensität betrug nicht mehr als 6–7%. Im ¹H-NMR-Spektrum überlappte das Signal zwar mit denen des 2'-Isomers von **7**, im ³¹P-¹H-Kopplungsspektrum waren sie aber eindeutig zu unterscheiden.

Einen sehr starken Beweis für die Annahme, dass unter unseren Bedingungen der Cyclisierungsweg über **19** fast vollständig umgangen wird, ergab die Verlängerung des ersten Reaktionsschritts auf eine Stunde bei Raumtemperatur (Schema 1). Dabei änderten sich die Intensitäten, Multiplizitäten und Verhältnisse der Signale (³¹P-NMR) für die 3'- und 2'-Isomere von **7** nicht. Die Signalintensität des cyclischen Monochloridats **19** blieb die gleiche wie zu Beginn der Reaktion (ca. 7–8%) anstatt zuzunehmen, wie man bei einer nucleophilen Beteiligung der *cis*-vicinalen Hydroxygruppe erwarten würde.

Die aus dem ersten Reaktionsschritt erhaltenen Gemische wurden mit MeOH umgesetzt (Schema 1) und die Reaktionen durch ³¹P-NMR-Spektroskopie verfolgt. Die Signale von **7**, **10** und **11** waren nach 5 min – der zur Aufnahme des ersten Spektrums erforderlichen Zeit – verschwunden. Gleichzeitig traten in den {¹H}-entkoppelten Spektren neue Resonanzen für die Produkte **13a**, **16** und **17** bei $\delta = 1.11$ und 0.92 (2'- und 3'-Isomer im Verhältnis ca. 35:65), 0.65 bzw. 0.8 auf. Nach 15 min ließen die Signale von **13a** auf eine quantitative Umsetzung schließen, während die von **16** und **17** nur 12.5% und 11% Umsatz anzeigten. Auch nach 24 h Reaktionszeit gab es keinen Hinweis auf die Bildung des cyclischen Triesters **23** (Schema 2).

Die in Tabelle 1 zusammengestellten kinetischen Parameter wurden durch RP-HPLC-Analyse von Proben erhalten, die dem Reaktionsgemisch nach Zugabe des Alkohols R³OH in regelmäßigen Abständen entnommen wurden. Die Molenbrüche der Produkte wurden aus den zugehörigen Signalfächern berechnet, die Halbwertszeiten ($\tau_{1/2}$) wurden anschließend aus den kinetischen Kurven erhalten. Die Ausbeuten der Ribotriester **13–15** beziehen sich auf Gemische der 3'- und 2'-Isomeren (Verhältnis ca. 65:35 nach RP-HPLC).

Durch die Verwendung aprotischer Lösungsmittel bei diesen Untersuchungen hofften wir, die Bedingungen an aktiven Zentren nachzuahmen, an denen Wassermoleküle nur begrenzt vorhanden oder völlig ausgeschlossen sind. Nach unserer Interpretation der Ergebnisse ändern nichtwässrige

Lösungsmittel die Art der Beteiligung der *cis*-vicinalen Hydroxygruppe von nucleophil in elektrophil. Die hier beschriebene, leicht durchzuführende In-situ-Phosphorylierung beseitigt Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Einführung von Schutzgruppen und der Verwendung von komplizierten Phosphorylierungsmitteln. Die Methode kann daher in der Nucleosidchemie bei der Einführung von Phosphorylgruppen von allgemeinem Nutzen sein.

Experimentelles

Analytische RP-HPLC wurde an einer NUCLEOSIL-100-5C₁₈-Säule (12.5 cm × 4.6 mm) mit isokratischer Elution (10–55 % CH₃CN, je nach ROH, in 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 7.0) durchgeführt (UV-Detektor, 254 nm). Für die präparative HPLC wurde eine halbpräparative NUCLEOSIL-100-5C₁₈-Säule (25 cm × 8 mm) mit isokratischer Elution (20–68 % CH₃CN im gleichen Puffer) verwendet. ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren wurden mit einem BRUKER-Avance-DRX-250-Spektrometer mit TMS als internem Standard bzw. 85 % H₃PO₄ als externem Standard bei Raumtemperatur aufgenommen.

Allgemeine Vorschrift: Eine gekühlte Lösung (5 °C) von POCl₃ (1 mmol) in 4 mL wasserfreiem CH₂Cl₂ wurde tropfenweise mit Pyridin (4 mmol) versetzt. Nachdem das anfängliche Rauchen abgeklungen war, wurde die nun klare Lösung zu einer vorgekühlten Mischung (5 °C) des 5'-O-geschützten Nucleosids (0.2 mmol) und Pyridin (4 mmol) in 4 mL wasserfreiem CH₂Cl₂ gegeben und das Reaktionsgemisch 5–10 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der jeweilige Alkohol (4 mmol) zugefügt, und es wurde bis zum vollständigen Umsatz gerührt (laut RP-HPLC und ³¹P-NMR-Spektrum). Das Reaktionsgemisch wurde anschließend unter vermindertem Druck (maximal 40 °C) zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in Acetonitril gelöst und an einer halbpräparativen RP-HPLC-Säule getrennt. Von substanzhaltigen Fraktionen (2'- und 3'-Isomere können getrennt gesammelt werden) wurde sofort das Lösungsmittel verdampft (verminderter Druck, maximal 40 °C), die Produkte wurden mehrmals durch azeotropes Verdampfen mit wasserfreiem Acetonitril oder CH₂Cl₂ getrocknet und im Exsiccator aufbewahrt. Reine Proben der Triester **13**–**18** wurden durch wasserfreie Extraktion aus dem anorganischen Puffersalz in Acetonitril oder CH₂Cl₂ hergestellt. Die ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren und die chromatographischen Eigenschaften der isolierten Verbindungen stimmten mit denen entsprechender Phosphotriester überein, die nach einem anderen Verfahren hergestellt wurden (siehe Lit. [4–6]).

Eingegangen am 17. August 1999,
veränderte Fassung am 12. November 1999 [Z13891]

- [1] B. N. Tawrick, A. T. Dauher, J. K. Bashkin, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 939–960.
- [2] a) W. P. Jencks, *Chem. Rev.* **1985**, 85, 511–527; b) E. Buncel, H. Wilson, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1977**, 14, 133–202.
- [3] C.-W. Su, J. M. Watson, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1854–1857, zit. Lit.
- [4] M. Kosonen, M. Oivanen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3704–3708.
- [5] M. Kosonen, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1203–1209.
- [6] A. Kraszewski, J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2935–2936.
- [7] R. Magolda, P. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1167–1170.
- [8] M. J. Robins, S. R. Naik, A. S. K. Lee, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1891–1899.
- [9] D. M. Brown, D. I. Magrath, A. H. Nielson, A. R. Todd, *Nature* **1956**, 177, 1124–1128.
- [10] D. M. Brown, *Basic Princ. Nucleic Acid Chem.* **1974**, 2, 1–90.
- [11] D. Herschlag, F. Ekstein, T. R. Cech, *Biochemistry* **1993**, 32, 8312–8321.
- [12] a) S. B. Tzokov, I. T. Devedjiev, E. K. Bratovanova, D. D. Petkov, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2401–2402; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*

1994, 33, 2302–2303; b) S. B. Tzokov, I. T. Devedjiev, D. D. Petkov, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 12–13; c) S. B. Tzokov, R. T. Momtcheva, N. G. Vassilev, J. Kaneti, D. D. Petkov, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5103–5107.

- [13] T. C. Bruice, T. H. Fife, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1973–1979.
- [14] a) E. Ciuffarin, A. Loi, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1047–1051; b) R. L. Snell, C. D. Chanler, J. T. Leach, R. Lossin, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 5106–5107.
- [15] J. G. Verkade, L. D. Quin, *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereochemical Analysis*, VCH, Deerfield Beach, FL, USA, **1987**, S. 365–389.

Eisenvermittelte diastereoselektive Spiroanellierungen mit vinylogenen Urethanen – ein neuer Zugang zu spiroanellierten Carbo- und Heterocyclen**

Hans-Joachim Knölker,* Elke Baum,
Helmut Goesmann, Hella Gössel, Konrad Hartmann,
Mike Kosub, Ulrike Locher und Thomas Sommer

Tricarbonyl(η^4 -1,3-dien)eisen-Komplexe werden in der organischen Synthese vielseitig eingesetzt;^[1] unter anderem werden sie zur stereoselektiven Spirocyclisierung angewendet.^[2] Wir berichteten vor einigen Jahren über die diastereoselektive eisenvermittelte Spiroanellierung von Arylaminen zu Spirotetrahydrochinolinen.^[3, 4] Die Reaktion des Eisen-Komplexsalzes **1** mit *p*-Anisidin liefert den Tricarbonyleisen-Komplex **3** mit einem Spiro[chinolin-4,1'-cyclohexan]-Grundgerüst (Schema 1).^[3] Durch Deuterium-Markierung konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Eintopf-Spiroanellierung über das intermediäre Tricarbonyleisen-komplexierte 1-Vinyl-4-methoxycyclohexadienyl-Kation **2** verläuft.^[5] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Arylamine, die eine höhere Nucleophilie in der *ortho*-Amino-Position aufweisen, bei ihrer Reaktion mit **1** eine Umkehr der Regioselektivität zeigen, die zu einem Spiro[chinolin-2,1'-cyclohexan]-Grundgerüst führt.^[4] Die eisenvermittelte Spiroanellierung von Arylaminen wurde zur Synthese einer tetracyclischen Substruktur der Discorhabdin-Alkaloide genutzt.^[6] Hier beschreiben wir eine bemerkenswerte Erweiterung der Anwendungsbreite der eisenvermittelten Spiroanellierung, bei der vinyloge Urethane als Substrate in der Reaktion mit dem Komplexsalz **1** eingesetzt werden.

- [*] Prof. Dr. H.-J. Knölker, Dipl.-Chem. H. Gössel, Dr. K. Hartmann, Dr. M. Kosub, Dipl.-Chem. U. Locher, Dr. T. Sommer
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-698-529
E-mail: knoe@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de
Dr. E. Baum, Dr. H. Goesmann
Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität
Engesserstraße, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
- [**] Übergangsmetall-Komplexe in der organischen Synthese, 56. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kn 240/5-3) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.
55. Mitteilung: H.-J. Knölker, A. Braier, D. J. Bröcher, P. G. Jones, H. Piotrowski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 8075.