

Bernd Jastorff und Traute Krebs

## Analoge des Adenosin-(3'.5')-cyclophosphats mit Stickstoff und Schwefelatomen im Phosphatring<sup>1)</sup>

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen  
(Eingegangen am 2. Mai 1972)

Die Darstellung des Cycloamids der 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin-3'-phosphorsäure mit einer  $\gamma$ -Dimethylamino-propylgruppe am Amidstickstoff (4) sowie die Synthese von 5'-N-substituierten Amidoanalogen **9** des Adenosin-(3'.5')-cyclothiophosphats werden beschrieben. Als Zwischenprodukte lassen sich die cyclischen *p*-Nitro-phenylesteramide **5** bzw. **10** isolieren. Der Schwefel im Thiophosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester] des 5'-Amino-5'-desoxy-adenosins **8a** ist ungewöhnlich alkalilabil. Die P—N-Bindung der Cyclothiophosphate **9** ist bei pH 5 um etwa 40 % stabiler als in den entsprechenden P=O-Verbindungen<sup>2)</sup>.

### Analogues of Adenosine 3'.5'-cyclic Phosphate Containing Nitrogen and Sulphur in the Phosphate Ring<sup>1)</sup>

The preparation of the cycloamide of 5'-amino-5'-deoxyadenosine 3'-phosphate (4), in which the 5'-nitrogen carries a  $\gamma$ -dimethylaminopropyl group, and the syntheses of 5'-N-substituted amido analogues **9** of adenosine 3'.5'-cyclic thiophosphate are reported. The cyclic *p*-nitrophenyl phosphoramidate esters **5** and **10** may be isolated as intermediates. The sulphur atom in the dinitrophenyl thiophosphate ester of 5'-amino-5'-deoxyadenosine **8a** is unusually alkali-labile. The P—N bond of cyclic thiophosphate **9** is about 40 % more stable at pH 5 than that of the corresponding P=O compound<sup>2)</sup>.

Adenosin-(3'.5')-cyclophosphat (cAMP) wurde in den letzten Jahren als eines der wichtigsten niedermolekularen Regulationsmoleküle auf allen Stufen der Evolution erkannt<sup>3)</sup>. So stimuliert es die mRNA-Synthese der induzierbaren Enzyme in Bakterien<sup>4)</sup>, aktiviert das Myxamöben-Stadium des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* zur Aggregation<sup>5)</sup> und übermittelt die Botschaft einer großen Zahl von Hormonen an die verschiedenen Enzymsysteme in den Zellen der Säugetiere<sup>6)</sup>.

Während eine Reihe von Rezeptorsystemen des cAMP bereits isoliert und beschrieben sind<sup>7)</sup>, ist über die molekulare Wechselwirkung zwischen Proteinrezeptor und Nucleotid so gut wie nichts bekannt. Offen ist auch, ob cAMP in allen genannten

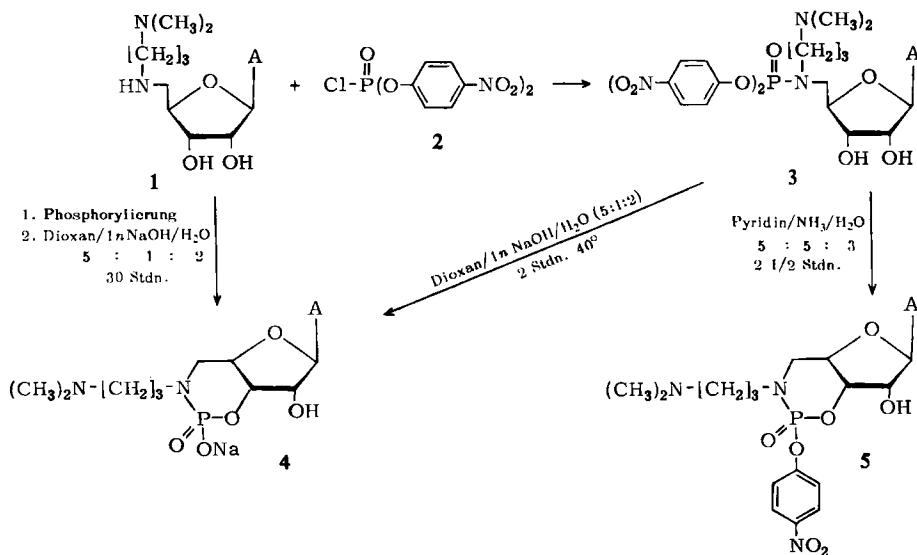
- 1) Nucleotidanaloge mit P—N-Bindung, VI; V. Mitteil.: *W. Freist, K. Schattka, F. Cramer und B. Jastorff*, Chem. Ber. 105, 991 (1972).
- 2) *A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer und H. Hettler*, J. org. Chemistry 36, 3029 (1971).
- 3) *J. P. Jost und H. V. Rickenberg*, Annu. Rev. Biochem. 40, 741 (1971).
- 4) *I. Pastan und R. Perlman*, Science [New York] 169, 339 (1970).
- 5) *T. M. Konijn, D. S. Barkley, Y. Y. Chang und J. T. Bonner*, Amer. Naturalist 102, 225 (1968).
- 6) *E. W. Sutherland, G. A. Robison und W. R. Butcher*, Circulation [New York] 37, 279 (1968).
- 7) *I. Pastan und R. Perlman*, Nature New Biology 229, 5 (1971).

Systemen nach demselben Wirkungsmechanismus reagiert. Zur Klärung dieser Fragen können in erster Linie die biologischen Untersuchungen mit Analogen des cAMP beitragen.

Zahlreiche Synthesen modifizierter cAMP-Derivate wurden in jüngster Zeit von verschiedenen Autoren veröffentlicht<sup>8-12</sup>; unter anderem berichteten wir über die Darstellung von 5'-Amido-Analogen des cAMP<sup>2</sup>). Erste biologische Untersuchungen mit diesen Verbindungen haben ergeben, daß die vorgenommene Veränderung in der Struktur des Cyclophosphatringes einen großen Einfluß auf die biologische Aktivität hat<sup>13-15</sup>.

Bei der Synthese der Amido-Analogen stellte die geringe Stabilität der P—N-Bindung ein großes Problem dar<sup>2)</sup>. Auch unter biologischen und pharmakologischen Aspekten ist es wünschenswert, Amido-Derivate mit stabilerer Cyclophosphatstruktur zu haben. In dieser Arbeit berichten wir über Versuche, die P—N-Bindung zu stabilisieren.

Der einleitende Schritt für die Hydrolyse der P–N-Bindung ist die Protonierung des Amidstickstoffs<sup>16)</sup>. Durch Substitution an diesem Stickstoff und Ersatz von  $\text{P}=\text{O}$  durch  $\text{P}=\text{S}$  hofften wir, die Spaltung in schwach saurem und neutralem Bereich zu verhindern.



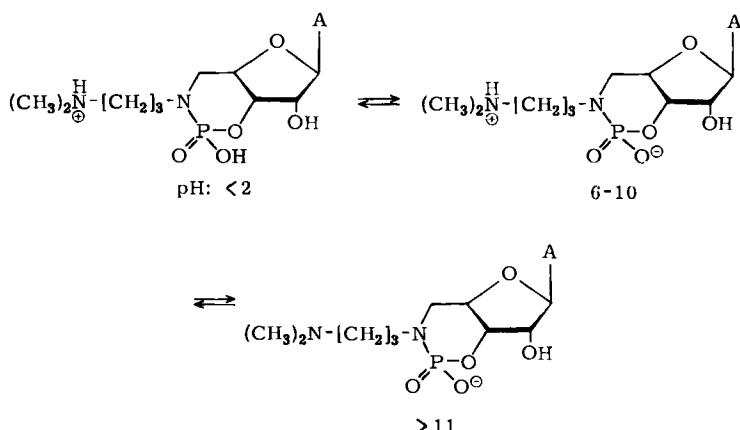
- 8) *K. Muneyama, R. J. Bauer, D. A. Shuman, R. K. Robins und L. N. Simon*, Biochemistry **10**, 2390 (1971).
  - 9) *G. H. Jones, H. P. Albrecht, N. P. Damodaran und J. G. Moffatt*, J. Amer. chem. Soc. **92**, 5510 (1970).
  - 10) *G. Michal, M. Nelböck und G. Weimann*, Z. analyt. Chem. **252**, 189 (1970).
  - 11) *F. Eckstein*, J. Amer. chem. Soc. **92**, 4718 (1970).
  - 12) *T. Posternak, J. Marcus und G. Cehovic*, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **272**, 622 (1971).
  - 13) *T. M. Konijn und B. Jastorff*, unveröffentlichte Ergebnisse, Utrecht 1971.
  - 14) *H. P. Baer*, University of Alberta, Canada, persönl. Mitteil. 1972.
  - 15) *I. Pastan*, National Institutes of Health, Bethesda, USA, persönl. Mitteil. 1972.
  - 16) *A. J. Kirby und S. G. Warren*, The Organic Chemistry of Phosphorus, 1. Aufl. S. 295, Elseviers Publ. Comp., Amsterdam, London, New York 1967.

Als Modellsubstituent wurde die  $\gamma$ -Dimethylamino-propylgruppe gewählt und bei der Synthese dem von Murayama et al.<sup>2)</sup> beschriebenen Weg gefolgt.

Das Aminoadenosin-Derivat **1** erhielt man nach bekannter Methode<sup>2)</sup> durch Aminolyse von 5'-O-Tosyl-adenosin in  $\gamma$ -Dimethylamino-propylamin. Die Phosphorylierung von **1** mit Phosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester]-chlorid (**2**) ergab in 35 proz. Ausbeute das Dinitrophenylesteramid **3**, das sich durch Behandlung mit Dioxan/1*n* NaOH/Wasser (5:1:2) in das Cyclonucleotid **4** umwandeln ließ. Die Reaktion verläuft sehr wahrscheinlich über das cyclische Nitrophenylesteramid **5**, dessen Bildung chromatographisch durch Nachweis einer Nitrophenylgruppe und der substituierten 3'-Hydroxylgruppe eindeutig bestätigt wurde.

Die Isolierung der Verbindungen **3** und **5** bereitete große Schwierigkeiten, da die hohe Basizität der Dimethylaminogruppe in Lösung zu unkontrollierter Abspaltung von *p*-Nitro-phenol führte und zudem die chromatographische Auftrennung der Reaktionsgemische erschwerte. Durch eine Eintopfreaktion, bei der nach der Phosphorylierung das Reaktionsgemisch direkt mit Alkali behandelt wurde, ließ sich **4** ohne Isolierung der Zwischenstufen darstellen.

Die erwünschte Stabilisierung der P—N-Bindung in **4** wurde nur teilweise erreicht. Zwar war die Spaltungsrate bei pH 5 geringer als z. B. für die entsprechende *N*-Benzyl-verbindung<sup>2)</sup> (s. Tab. 2), aber vollständige Stabilität im physiologisch wichtigen pH-Bereich ließ sich nicht erreichen. Hingegen konnten wir die beabsichtigte Beeinflussung der elektrostatischen Eigenschaften von **4** durch den basischen Rest einwandfrei mit Hilfe der Elektrophorese nachweisen. Die Ladungsverteilung im Molekül ändert sich in Abhängigkeit vom pH des Laufmittels. Unterhalb von pH 2 trägt **4** nur eine positive Ladung, zwischen pH 6 und 10 ist das Molekül elektrisch neutral und erst oberhalb von pH 11 verhält es sich wie ein normales Cyclophosphat mit einer negativen Ladung. Den beobachteten Zuständen kommen wohl die folgenden Strukturen zu.



Die scheinbare Neutralität von **4** im physiologischen pH-Bereich eröffnet die Möglichkeit der besseren Permeabilität durch Zellmembranen, als das bei cAMP wegen der negativen Ladung möglich ist<sup>17)</sup>. Sollte **4** biologische und pharmakologische

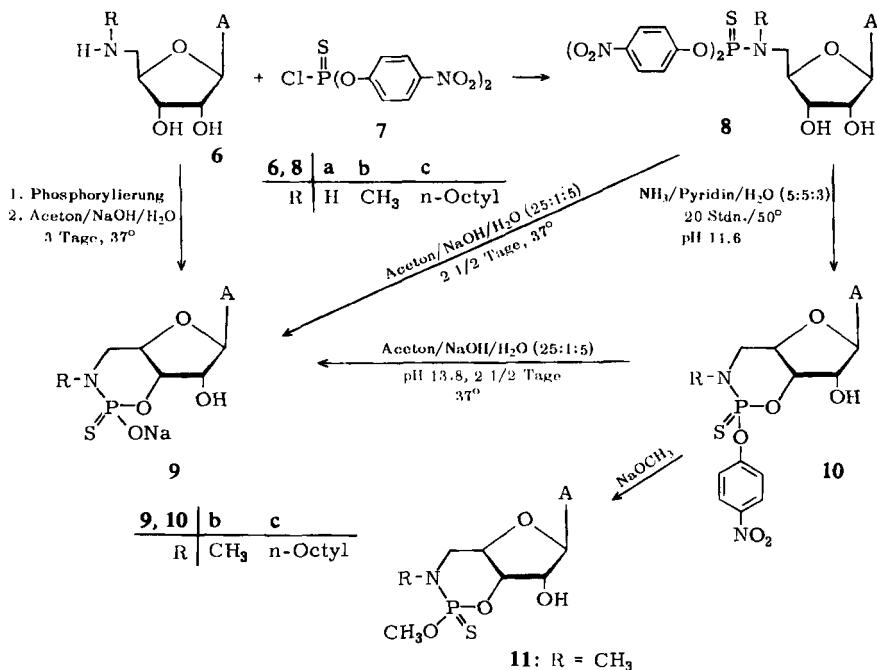
<sup>17)</sup> E. Kaukel und H. Hiltz, Biochem. biophysic. Res. Commun. **46**, 1011 (1972).

Aktivität zeigen, wäre eine erhöhte Membranpermeabilität von größter Bedeutung. Entsprechende Versuche werden zur Zeit in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen durchgeführt.

Einen anderen Weg zur Stabilisierung der P=N-Bindung sahen wir in der Synthese von 5'-Amido-Analogen **9** des Adenosin-(3',5')-cyclophosphats. Als Modellverbindungen wurden Amidogruppen mit den Resten H, Methyl und n-Octyl gewählt.

Den für die P=O-Derivate angegebenen Reaktionsweg<sup>2)</sup> modifizierte man nur dahingehend, daß im ersten Schritt Thiophosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester]-chlorid (**7**)<sup>18)</sup> eingesetzt wurde.

Die Cyclisierung der Verbindungen **8b** und **8c** zu **9b** und **9c** lief erst unter wesentlich stärker alkalischen Bedingungen und bei höherer Temperatur, als für die entsprechenden P=O-Derivate beschrieben, ab. Daß auch hier ein cyclisches Diesteramid **10** als Zwischenstufe auftritt, wurde durch Isolierung und Charakterisierung von **10b** und **10c** nachgewiesen. Die Cyclisierung von **8** zu **10** scheint stereospezifisch zu verlaufen, denn weder chromatographisch noch mit der <sup>31</sup>P-Kernresonanz ließen sich Diastereomere nachweisen, während diese bei den P=O-Derivaten chromatographisch getrennt und charakterisiert werden konnten<sup>19)</sup>.

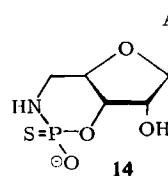
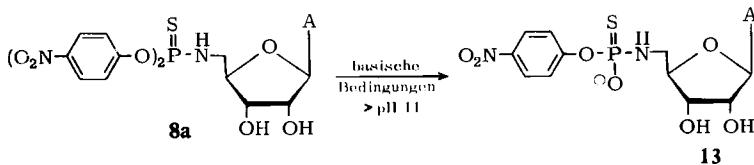
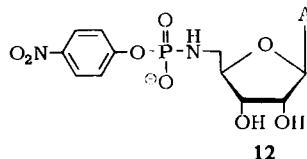


graphisch getrennt und charakterisiert werden konnten<sup>19)</sup>. Die Verbindungen vom Typ **10** erwiesen sich als reaktionsfähige Zwischenstufen. So konnte man z. B. mit Natriummethylat den *p*-Nitro-phenylester quantitativ ohne Ringöffnung in einen Methylester **11** umwandeln. Die Verbindungen **9b** und **9c** ließen sich auch nach dem oben erwähnten Eintopfverfahren in guten Ausbeuten darstellen.

<sup>18)</sup> R. Goody, unveröffentlichte Ergebnisse, Göttingen 1971.

<sup>19)</sup> A. Murayama und B. Jastorff, unveröffentlichte Ergebnisse, Göttingen 1971.

Einen völlig anderen Reaktionsverlauf beobachtete man bei der alkalischen Behandlung des nicht *N*-substituierten Thioamids **8a**. Man erhielt stets zahlreiche Produkte, deren Zusammensetzung in Abhängigkeit vom pH der Cyclisierungsbedingungen wechselte. Durch chromatographische Analyse der jeweiligen komplexen Reaktionsgemische ließen sich neben einer Reihe nicht identifizierbarer Substanzen, die Verbindungen **12**, **13** und **14** nachweisen.



Die Verbindung **12**, die bereits in der Literatur beschrieben ist<sup>2)</sup>, entsteht durch Hydrolyse einer *p*-Nitro-phenylgruppe und des Schwefels. Die ungewöhnliche alkalische Entschwefelung tritt bevorzugt im pH-Bereich 11–12.5 auf, oberhalb von pH 12.5 tritt sie zugunsten der Bildung von **13** zurück und ab pH 13.5 findet man weder **12** noch **13**, sondern **14**. Allerdings war die Ausbeute an **13** und **14** stets so gering, daß ihre präparative Darstellung auf diesem Wege nicht lohnt. Ein cyclisches Diesteramid vom Typ **10** wurde überhaupt nicht beobachtet. Verantwortlich für dieses ungewöhnliche Verhalten von **8a** ist wohl die durch die *p*-Nitro-phenylgruppen bedingte hohe Labilität seines Amidprotons.

Mit der Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel wächst die Stabilität der P–N-Bindung der Amidoanalogen des cAMP im Bereich pH 5–7 um etwa 40% (s. Tab. 2; die Werte für die entsprechenden P=O-Derivate sind in l. c.<sup>2)</sup> angegeben). Man findet allerdings auch hier wieder die charakteristische Abhängigkeit der Stabilität von der Art des Substituenten am Stickstoff. So ist wie bei den P=O-Verbindungen das n-Octylderivat **9c** wesentlich stabiler als die entsprechende Methylverbindung **9b**.

Inwieweit die Einführung von Schwefel in den Phosphatrings die biologische Aktivität der Amidoanalogen des cAMP beeinflußt, wird zur Zeit untersucht.

Herrn Prof. Dr. F. Cramer danken wir für interessante Diskussionen und stete wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. H. M. Schiebel, Stöckheim, sind wir für die Aufnahme und Analyse der Massenspektren, Herrn B. Seeger für die Messung der NMR-Spektren zu Dank verpflichtet.

## Beschreibung der Versuche

### Allgemeine Bemerkungen

Die UV-Spektren wurden in Methanol im Unicam SP 1800, die IR-Spektren mit dem Infracord (Perkin-Elmer) gemessen. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden mit dem Multikern-Spektrometer HX 60/4-12 von Bruker, die Massenspektren mit einem MS-9-Gerät (AEI) bei 70 eV aufgenommen. Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Ausbeuten wurden zum Teil dünnsschichtchromatographisch mit dem Vitatron-Dünnsschicht-Densitometer TLD 100 bestimmt.

Zur Erkennung von 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin auf Dünnsschichtplatten bzw. Papier diente das 0.1 proz. Ninhydrin-Sprühreagenz der Fa. Merck, zum Nachweis der sekundären Aminonucleoside **1**, **6b** und **6c** verwendete man das Nitroprussidnatrium-Acetaldehyd-Reagenz<sup>20)</sup>. Vicinale Hydroxylgruppen wurden mit dem Benzidin-Natriummetaperjodat-Reagenz<sup>21)</sup> nachgewiesen. Zum Nachweis von Schwefel in Derivaten mit mindestens einer negativen Ladung diente auf Dünnsschichtplatten bzw. Papier ein Sprühreagenz, bestehend aus 1 g Natriumazid, 1 g löslicher Stärke und 1 g Jod auf 100 ccm Wasser<sup>22)</sup>. Man erhält damit weiße Flecken auf blauem Grund. Zur Identifizierung der Nitrophenylgruppen sprühte man mit 1 n NaOH und erwärme auf 100°.

Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043b Mgl; Laufmittelsysteme: n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2) (A) bzw. Äthanol/1m Ammoniumacetat (7:3) (B). Dünnsschichtchromatographie: Für analytische Zwecke wurden Silicagel-Dünnsschichtplatten F 254 (Merck AG) bzw. Aluminiumoxid-Dünnsschichtplatten F 254, basisch, Typ T (Merck AG), für präparative Trennungen Silicagel-PF 254-Platten (Merck AG) verwendet. Laufmittelsysteme: A bzw. Aceton/Benzol/Wasser (C), bzw. Chloroform/Methanol (9:1) (D) bzw. (85:15) (E) bzw. Aceton/Benzol/1m Ammoniak/Wasser (8:2:0.5:0.5) (F). Elektrophorese: Papier Schleicher & Schüll 2043b Mgl. Laufmittel: 0.1m Triäthylammonium-hydrogencarbonat-Puffer pH 7.4 (G) bzw. Natriumborat-Natronlauge-Puffer pH 10 (H) bzw. Citrat-Salzsäure-Puffer pH 2 (Merck AG) (I) bzw. Kaliumchlorid-Natronlauge pH 13 (Merck AG) (K). Die in der Tabelle aufgeführten  $R_f$ -Werte waren hinreichend reproduzierbar. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel 0.05–0.2 mm der Firma Merck, zur Ionenaustauschchromatographie Ionenaustauscher Merck IV (schwachsauer, H<sup>+</sup>-Form), der vor Benutzung intensiv bis zum völligen Verschwinden jeglicher UV-Aktivität mit Methanol gewaschen und anschließend regeneriert werden mußte.

Schmelzpunkte, Spektraldaten und  $R_f$ -Werte der dargestellten Verbindungen s. Tab. 1.

**5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin (1):** Eine Suspension von 1.266 g (3 mMol) 5'-O-[*p*-Toluolsulfonyl]-adenosin in 10 ccm  $\gamma$ -Dimethylamino-propylamin wurde 5 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Eindampfen zur Trockne suspendierte man das Rohprodukt zur völligen Entfernung des Propylamins in 3 l Äther und schüttelte über Nacht. Nach Abfiltrieren wurde der Rückstand in wenig Wasser auf einer mit 30 ccm schwach saurem Ionenaustauscher (Merck IV, H<sup>+</sup>-Form)<sup>23)</sup> gefüllten Säule adsorbiert und solange mit Wasser gewaschen, bis UV-spektroskopisch keine *p*-Toluolsulfonsäure und andere Verunreinigungen mehr nachweisbar waren ( $\sim$ 10 l). Durch Elution mit einem linearen Gradienten Wasser  $\rightarrow$  0.5 m Ammoniak (je 1.5 l) erhielt man nach anschließender Gefrier-trocknung das einheitliche Aminonucleosid **1**. Ausb. 1.0 g (95%).

<sup>20)</sup> Anfärbereagenzien für Dünnsschicht- und Papierchromatographie Nr. 241, E. Merck AG., Darmstadt 1970.

<sup>21)</sup> a. a. O., Nr. 218.

<sup>22)</sup> D. Shire, unveröffentlichte Ergebnisse, Göttingen 1971.

<sup>23)</sup> Vorbehandlung s. allgemeine Bemerkungen.

Tab. 1. Schmelzpunkte, Analysen, Spektraldaten und

Substanzen	Nr.	UV (Methanol) $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse Ber. Gef.	$^1\text{H-NMR}$ a) $\delta$ (ppm) $J$ (Hz)
5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin	1	259		$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_3$ (351.3)	C 51.28 51.05 H 7.18 7.38 N 27.91 27.63	1.52 (q/2H; $J = 7.5$ ) 2.10 (s/6H) 2.20 (t/4H; $J = 7.5$ ) 5.67 (d/1H) 1'-H
N-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propyl]-N-[5'-desoxy-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-bis-[ <i>p</i> -nitro-phenyl-ester]-amid	3	265	142 – 144°	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{P}$ (673.6)		1.50 – 2.00 (m/2H) 2.30 (s/6H) 5.95 (d/1H; $J = 6$ ) 1'-H 7.25 – 7.60 (m/4H) 8.13 – 8.46 (m/4H)
Cycloamid des 5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin-3'-phosphorsäure-[ <i>p</i> -nitro-phenylesters]	5	262		$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_7\text{P}$ (534.5)		
Cycloamid der 5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin-3'-phosphorsäure, Na-Salz	4	260		$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_5\text{P}\text{Na}$ (435.4)		1.50 – 2.00 (m/2H) 2.30 (s/6H) 6.10 (s/1H) 1'-H
N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]-thiophosphorsäure-bis-[ <i>p</i> -nitro-phenyl-ester]-amid	8a	265		$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}_9\text{PS}$ (604.5)		5.95 (d/1H; $J = 6$ ) 1'-H 7.30 – 7.66 (m/4H) 8.17 – 8.52 (m/4H)
N-Methyl-N-[5'-desoxy-adenosyl-(5')]-thiophosphorsäure-bis-[ <i>p</i> -nitro-phenylester]-amid	8b	265	115 – 117°	$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_9\text{PS}$ (618.1)	C 44.70 44.83 H 3.75 3.78 N 18.14 18.26	3.07 (d/3H; $J = 13.2$ ) 5.98 (d/1H) 1'-H 7.29 – 7.61 (m/4H) 8.09 – 8.40 (m/4H)
Cycloamid des 5'-Methyl-amino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure-[ <i>p</i> -nitro-phenylesters]	10b	262	236 – 237°	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_6\text{PS}$ (479.4)	C 42.59 42.54 H 3.76 3.91 N 20.45 20.35	2.98 (d/3H; $J = 13.2$ ) 6.10 (s/1H) 1'-H 7.54 (dd/2H; $J_1 = 9$ , $J_2 = 1.8$ ) 8.28 (dd/2H; $J_1 = 9$ , $J_2 = 1.8$ )
Cycloamid des 5'-Methyl-amino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure-methylesters	11	260		$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_4\text{PS}$ (372.4)	C 38.70 38.50 H 4.60 4.71 N 22.56 22.30	2.83 (d/3H; $J = 13.2$ ) $\text{NCH}_3$ 3.67 (d/3H; $J = 12.5$ ) $\text{OCH}_3$ 5.97 (s/1H) 1'-H
Cycloamid der 5'-Methyl-amino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure, Na-Salz	9b	260		$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4\text{PS}\text{Na}$ (380.4)		2.74 (d/3H; $J = 13.2$ ) 6.02 (s/1H) 1'-H
N-n-Octyl-N-[5'-desoxy-adenosyl-(5')]-thiophosphorsäure-bis-[ <i>p</i> -nitro-phenylester]-amid	8c	265	85 – 87°	$\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_9\text{PS}$ (716.7)	C 50.32 50.07 H 5.21 5.37 N 15.63 15.38	0.83 (m/3H) 1.24 (m/14H) 5.98 (d/1H; $J = 5$ ) 1'-H 7.28 – 7.62 (m/4H) 8.10 – 8.40 (m/4H)
Cycloamid des 5'-n-Octyl-amino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure-[ <i>p</i> -nitro-phenylesters]	10c	262	208°	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}$ (577.8)	C 49.90 50.01 H 5.63 5.58 N 16.97 16.84	0.83 (m/3H) 1.28 (m/14H) 6.10 (s/1H) 1'-N 7.56 (dd/2H; $J_1 = 9$ , $J_2 = 1.8$ ) 8.30 (dd/2H; $J_1 = 9$ , $J_2 = 1.8$ )
Cycloamid der 5'-n-Octyl-amino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure, Na-Salz	9c	259		$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_4\text{PS}\text{Na}$ (478.5)		0.83 (m/3H) 1.28 (m/14H) 6.10 (s/1H) 1'-H

a) An NMR-Daten wurden nur die für neueingeführte Gruppen beweisenden Signale sowie das sich bei der Cyclisierung charakteristisch ändernde 1'-H-Proton aufgeführt ( $d_6$ -DMSO; int. Standard: Tetramethylsilan).

b) Die Werte wurden auf 30proz. Phosphorsäure als externen Standard bezogen.

*R*<sub>F</sub>-Werte der dargestellten Verbindungen

<sup>31</sup> P-NMR <sup>b</sup> (ppm)	Massenspektrum <i>m/e</i> (rel. Int.)	Elektro- phorese <sup>d</sup> H	<i>R</i> <sub>F</sub> -Werte		Dünnenschicht- chromatographie <sup>c</sup>		
			A	B	A	C	D
—	351 (4%) M <sup>⊕</sup> 136 (90%) B <sup>⊕</sup> + 1 <sup>c</sup> 58 (100%) C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sup>⊕</sup>	0.07	0.6	0.66	0.8	0	0
—	139 (96%) pNP <sup>⊕</sup> 136 (8%) B <sup>⊕</sup> + I 135 (18%) B <sup>⊕</sup> 109 (100%) pNP <sup>⊕</sup> - NO 58 (12%) C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sup>⊕</sup>	—	—	0.80	0.92	0.15	0
—	—	—	—	0.73	0.94	0	0
—	—	pH 2: -0.8 pH 7: 0 pH 13: 0.5	0.4	0.45	0.8	0	0
-62.55	139 (78%) pNP <sup>⊕</sup> 136 (43%) B <sup>⊕</sup> + 1 109 (100%) pNP <sup>⊕</sup> - NO	—	—	0.84	—	1.2	1.5
-65.78	478 (1%) M <sup>⊕</sup> - pNP 139 (49%) pNP <sup>⊕</sup> 135 (47%) B <sup>⊕</sup> 109 (100%) pNP <sup>⊕</sup> - NO	—	—	0.83	—	1.2	1.5
-67.5	480 (1%) M <sup>⊕</sup> + I 326 (80%) M <sup>⊕</sup> - pNP - CH <sub>3</sub> 194 (49%) B <sup>⊕</sup> + C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 164 (53%) B <sup>⊕</sup> + CHO 139 (5%) pNP <sup>⊕</sup> 136 (100%) B <sup>⊕</sup> + 1	—	—	0.83	—	1.2	2.5
-74.4	373 (2%) M <sup>⊕</sup> + 1 341 (1%) M <sup>⊕</sup> - OCH <sub>3</sub> 164 (30%) B <sup>⊕</sup> + CHO 136 (100%) B <sup>⊕</sup> + 1	—	—	0.82	—	1.1	2.1
-62.71	—	0.43	0.5	0.54	1.1	0.4	0
-65.29	581 (1%) M <sup>⊕</sup> - B 139 (100%) pNP <sup>⊕</sup> 135 (96%) B <sup>⊕</sup> 109 (78%) pNP <sup>⊕</sup> - NO	—	—	0.89	—	1.3	2.4
-67.1	578 (1%) M <sup>⊕</sup> + 1 194 (15%) B <sup>⊕</sup> + C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 164 (55%) B <sup>⊕</sup> + CHO 139 (3%) pNP <sup>⊕</sup> 136 (100%) B <sup>⊕</sup> + 1 109 (7%) pNP <sup>⊕</sup> - NO	—	—	0.91	—	1.3	2.8
-62.35	—	0.3	0.80	0.80	1.2	0.7	0

<sup>c</sup> B = Base; pNP = *p*-Nitro-phenol.<sup>d</sup> Die elektrophoretischen Beweglichkeiten wurden bezogen auf Adenosin-5'-phosphat als Standard.<sup>e</sup> Die dünnenschichtchromatographischen *R*<sub>F</sub>-Werte bezog man auf Thymidin.

*N-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propyl]-*N*-[5'-desoxy-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester]-amid (3):* 1 mMol **1** wurde durch dreimaliges Abdampfen mit je 10 ccm absol. Pyridin getrocknet, dann in einem Gemisch von 10 ccm absol. Pyridin/0.5 ccm absol. Tri-n-butylamin bei  $-40^\circ$  unter Röhren während 1 Stde. mit 465 mg (1.3 mMol) Phosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester]-chlorid (**2**) portionsweise versetzt und anschließend weitere 44 Stdn. bei  $4^\circ$  gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels nahm man den Rückstand in wenig Dioxan/Methanol (6 : 4) auf und trennte das Gemisch durch préparative Schichtchromatographie im System F<sup>24)</sup>. Da sowohl die Zone von **3** als auch die den Hydrolyseprodukten des Phosphorylierungsreagens **2** entsprechenden Zonen das UV-Licht bei 254 und 350 nm absorbieren, wurden sie mit Hilfe eines UV-Spektrums unterschieden (**3**:  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm; Reagenz:  $\lambda_{\text{max}}$  285 nm). Das Spektrum erhielt man durch Auskratzen einer kleinen Probe aus den fraglichen Zonen und Elution mit Dioxan/Methanol (6 : 4). Anschließend isolierte man **3** durch Auskratzen, eluierte mit Dioxan/Methanol (6 : 4) und fällte nach dem Eindampfen aus Äthanol mit Petroläther ( $40-60^\circ$ ) um. Ausb. 235 mg (35%).

*Cycloamid des 5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin-3'-phosphorsäure-[*p*-nitro-phenylesters] (5):* 11 mg (0.02 mMol) **3** wurden  $2\frac{1}{2}$  Stdn. bei  $37^\circ$  in 4 ccm Pyridin/konz. Ammoniak/Wasser (5 : 5 : 3) erwärmt. Nach dem Eindampfen der Lösung nahm man den Rückstand in wenig Dioxan/Methanol (6 : 4) auf und isolierte **5** durch préparative Schichtchromatographie auf basischem Aluminiumoxid im System F<sup>24)</sup>. Die **5** entsprechende Zone erkannte man einerseits an der Nitrophenolreaktion mit Natronlauge, andererseits an der Blaufärbung beim Tüpfeln eines kleinen Bereichs mit dem Benzidin-Perjodat-Reagenz. Ausb. 80% (spektralphotometrisch bestimmt).

*Cycloamid der 5'-[ $\gamma$ -Dimethylamino-propylamino]-5'-desoxy-adenosin-3'-phosphorsäure, Na-Salz (4):* 170 mg (0.25 mMol) Diesteramid **3** wurden 2 Stdn. bei  $40^\circ$  und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mit 25 ccm eines Gemischs aus 1*n* NaOH/Dioxan/Wasser (1 : 5 : 2) geschüttelt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels nahm man in wenig Methanol auf und trennte das Reaktionsgemisch durch préparative Schichtchromatographie auf basischem Aluminiumoxid in System A. Die **4** entsprechende Zone wurde durch folgende Kriterien identifiziert: UV-Absorption nur bei 254, nicht bei 350 nm, keine Gelbfärbung beim Tüpfeln mit Natronlauge, Blaufärbung beim Tüpfeln mit Benzidin-Perjodat-Reagenz. Man isolierte **4** durch Elution der ausgekratzten Zone mit System A, bestimmte UV-spektroskopisch die Konzentration ( $\epsilon = 15000$ ) und gab vor dem Eindampfen zur Stabilisierung eine etwa äquimolare Menge an Natronlauge dazu. Anschließend nahm man in wenig Wasser auf und lyophilisierte zu einer schwach gelben flockigen Substanz. Ausb. 44 mg (40%).

*Darstellung von 4 im Eintopfverfahren:* 353 mg (1 mMol) Aminonucleosid **1** wurde, wie bei der Darstellung von **3** beschrieben, mit 1.3 mMol **2** umgesetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels nahm man den Rückstand in 200 ccm Dioxan/1*n* NaOH/Wasser (5 : 1 : 2) auf und erwärme die Lösung 30 Stdn. auf  $40^\circ$ . Der Gang der Reaktion wurde chromatographisch verfolgt. Nach Eindampfen i. Vak. löste man in wenig Methanol und trennte das Reaktionsgemisch auf basischem Aluminiumoxid zunächst im System F vor, isolierte die Startzone und trennte diese nach der Elution mit System A erneut auf basischem Aluminiumoxid, diesmal in System A, auf. Die **4** entsprechende Zone wurde wie beschrieben auf der Platte identifiziert, ausgekratzt, mit System A eluiert, wie oben beschrieben mit Natronlauge stabilisiert und anschließend i. Hochvak. lyophilisiert. Ausb. 165 mg (38%).

<sup>24)</sup> In nicht ammoniakhaltigem System bleiben **3** bzw. **5** am Start. Die basischen Bedingungen führten allerdings in geringem Maße bereits zur Abspaltung von *p*-Nitro-phenol. Weder **3** noch **5** ließen sich daher völlig einheitlich isolieren.

**N-(5'-Desoxy-adenosyl-(5')-thiophosphorsäure-bis-[p-nitro-phenylester]-amid (8a):** 266 mg (1 mMol) 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin (6a)<sup>25)</sup> wurden zur Trocknung dreimal durch kurze Erwärmung auf 50° in je 20 ccm absol. Pyridin unter Feuchtigkeitsausschluß wieder eingedampft. Anschließend suspendierte man in 20 ccm absol. Pyridin, gab 1 ccm Tri-n-butylamin hinzu und kühlte das Gemisch unter Feuchtigkeitsausschluß auf -40° ab. Bei dieser Temperatur wurden 484 mg (1.3 mMol) Thiophosphorsäure-bis-[p-nitro-phenylester]-chlorid (7) während einer Stde. unter Rühren portionsweise aus einem 25-ccm-Steckkolben hinzugegeben und das Reaktionsgemisch anschließend weitere 24 Stdn. bei 4° gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels nahm man in wenig Methanol auf und trennte durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System E das Gemisch auf.

Die 8a entsprechende Zone wurde wie bei der Isolierung von 3 beschrieben durch das UV-Spektrum identifiziert, ausgekratzt, mit Dioxan/Methanol (6:4) eluiert und zu einem viskosen Öl eingedampft. Durch Lösen in wenig Äthanol und wieder Ausfällen mit Petroläther (40–60°) erhielt man 8a als schwach gelbfärbtes amorphes Pulver. Ausb. 513 mg (85%).

**N-Methyl- und N-n-Octyl-N-[5'-desoxy-adenosyl-(5')]-thiophosphorsäure-bis-[p-nitro-phenylester]-amid 8b bzw. 8c:** Je 1 mMol der Aminonucleoside 6b<sup>2)</sup> bzw. 6c<sup>2)</sup> wurden dreimal mit je 30 ccm absol. Pyridin unter Feuchtigkeitsausschluß abgedampft, dann in 20 bzw. 10 ccm absol. Pyridin mit jeweils 1 ccm Tri-n-butylamin versetzt. Bei -40° gab man während 1 Stde. portionsweise 484 mg (1.3 mMol) 7 hinzu und rührte anschließend weitere 40 Stdn. bei 4°. Nach Abdampfen des Lösungsmittels nahm man den Rückstand in wenig Chloroform auf und adsorbierte das Rohprodukt auf einer Kieselgelsäule. Man wusch dann solange mit Chloroform, bis keine UV-Aktivität (Pyridin/Nitrophenol) mehr nachweisbar war und chromatographierte anschließend mit System E bzw. D. Nach dem zuerst eluierten Phosphorylierungsreagenz (7) ( $\lambda_{\text{max}}$  290 nm) wurden die chromatographisch einheitlichen Produkte 8b und 8c isoliert. Durch Umfällen aus Äthanol mit Petroläther (40–60°) erhielt man beide Verbindungen als nahezu farbloses Pulver. Ausb. 8b: 580 mg (94%), 8c: 487 mg (68%).

**Cycloamide des 5'-Methylamino- bzw. 5'-n-Octylamino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure-[p-nitro-phenylesters] (10b) bzw. (10c):** 310 mg (0.5 mMol) 8b bzw. 360 mg (0.5 mMol) 8c wurden in 90 ccm Pyridin/konz. Ammoniak/Wasser (5:5:3) in einem abgeschmolzenen Glasrohr während 20 Stdn. auf 50° erwärmt. Anschließend dampfte man das Lösungsmittel ab, nahm in wenig Methanol/Dioxan (6:4) auf und trennte das in nahezu quantitativer Umsetzung gebildete 10b bzw. 10c durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System E bzw. D von p-Nitro-phenol und einer geringen Zone am Start. Durch Umfällen aus wenig Äthanol mit Wasser erhielt man 10b bzw. 10c als farbloses Pulver. Ausb. 10b: 227 mg (95%), 10c: 277 mg (96%).

**Cycloamide der 5'-Methylamino- bzw. 5'-n-Octylamino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure, Na-Salze (9b und 9c) aus 10b bzw. 10c:** 48 mg (0.1 mMol) 10b bzw. 58 mg (0.1 mMol) 10c wurden in 80 ccm Aceton/1n NaOH/Wasser (25:1:5) 65 Stdn. auf 37° erwärmt. Nach Eindampfen des Reaktionsgemisches nahm man in wenig Methanol auf, filtrierte von teilweise ungelöster Natronlauge ab und trennte 9b bzw. 9c durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System C von den an der Lösungsmittelfront laufenden Kondensationsprodukten des Acetons ab. Die 9b bzw. 9c entsprechende Zone wurde aufgrund des positiven Tüpfeltests auf Schwefel<sup>26)</sup> und durch das UV-Spektrum identifiziert. Man kratzte

<sup>25)</sup> B. Jastorff und H. Hettler, Chem. Ber. **102**, 4119 (1969).

<sup>26)</sup> Siehe allgemeine Bemerkungen.

die Zone aus, eluierte mit Methanol, engte bis fast zur Trockne ein und fällte **9b** bzw. **9c** mit wenig Wasser als hellgelbes amorphes Pulver aus. Die Umfällung wurde durch langsames Abdampfen des restlichen Methanols am Rotationsverdampfer ohne Wasserbad unterstützt. Ausb. **9b**: 21 mg (55%), **9c**: 31 mg (65%).

**Darstellung von 9b und 9c aus 8b und 8c:** Je 0.1 mMol **8b** bzw. **8c** wurden in 80 ccm Aceton/1n NaOH/Wasser (25:1:5) 3 Tage bei 37° gehalten. Die Isolierung von **9b** und **9c** erfolgte wie oben. Ausb. **9b**: 23 mg (60%), **9c**: 30 mg (63%).

**Darstellung von 9b und 9c im Eintopfverfahren aus 6b bzw. 6c: 1 mMol 6b<sup>2)</sup> bzw. 6c<sup>2)</sup>** wurde nach der für die Synthese der Diesteramide **8b** bzw. **8c** angegebenen Vorschrift mit Thiophosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester]-chlorid (7) phosphoryliert. Nach Eindampfen des Reaktionsgemisches erwärme man den Rückstand in 250 ccm Aceton/1n NaOH/Wasser (25:1:5) 3 1/2 Tage auf 37°. Anschließend wurde wieder zur Trockne eingedampft, in 10 bis 20 ccm Methanol aufgenommen, vom ungelösten Rückstand filtriert (man sollte sich durch Dünnschichtchromatographie des wasserlöslichen Rückstandes von der Abwesenheit der Substanz **9b** bzw. **9c** überzeugen) und das Reaktionsgemisch durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel zunächst in System E aufgetrennt. Die Startzone sowie die unmittelbar in der Nähe laufenden Zonen mit positiver Reaktion auf Schwefel wurden ausgekratzt, mit Methanol eluiert und nach dem Einengen bis fast zur Trockne in System C auf Kieselgel noch einmal aufgetrennt. **9b** bzw. **9c** wurde wie bereits beschrieben isoliert und als amorphes Pulver erhalten. Ausb. **9b**: 170 mg (45%), **9c**: 190 mg (40%).

**Cycloamid des 5'-Methylamino-5'-desoxy-adenosin-3'-thiophosphorsäure-methylesters (11):** 120mg (0.25 mMol) **10b** wurden in 30 ccm 1m NaOCH<sub>3</sub> 2 1/2 Tage bei 40° gehalten. Nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches suspendierte man in 10 ccm Wasser und extrahierte mit Essigester, bis keine UV-Aktivität mehr nachweisbar war. Die Esterphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, etwas eingeengt und durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System D aufgetrennt. Durch die fehlende Absorption des UV-Lichtes von 350 nm ließ sich die **11** entsprechende Zone von der wenig darüber laufenden **10b**-Zone, die sowohl bei 254 als auch bei 350 nm absorbiert, unterscheiden. Die Zone wurde ausgekratzt, mit Essigester eluiert, eingedampft und in wenig Äthanol aufgenommen. Dazu gab man Petroläther (40–60°) bis zur beginnenden Trübung und fällte **11** durch sehr langsames Eindampfen am Rotationsverdampfer ohne Wasserbad als weißes amorphes Pulver aus. Ausb. 42 mg (45%).

**Untersuchung der Stabilität der Verbindungen 4, 9b und 9c bei verschiedenem pH:** 1 mg der Verbindungen **4** bzw. **9b** bzw. **9c** wurde 5 Std. bei 37° in 20 µl Pufferlösung (pH 5, pH 7, pH 9) inkubiert. Anschließend chromatographierte man auf analytischen Kieselgelplatten in System A und bestimmte mit Hilfe des Densitometers den prozentualen Anteil an Spaltprodukt.

Tab. 2. Spaltung der P–N-Bindung von **4** und **9** in Pufferlösung

Verbindung	pH 5; %	pH 7; %	pH 9; %
<b>4</b>	52	9	2
<b>9b</b>	65	0	0
<b>9c</b>	24	0	0