

SYNTHÈSE DES 5'-THIO-3'-AMIDO-5',3'-DIDESOXYSYADENOSIN-3',5'-CYCLOPHOSPHATS,
EIN cAMP-DERIVAT MIT S UND N IM CYCLOPHOSPHATRING

Michael Morr

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH., D-3300 Braunschweig, Mascheroder Weg

(Received in Germany 20 April 1976; received in UK for publication 10 May 1976)

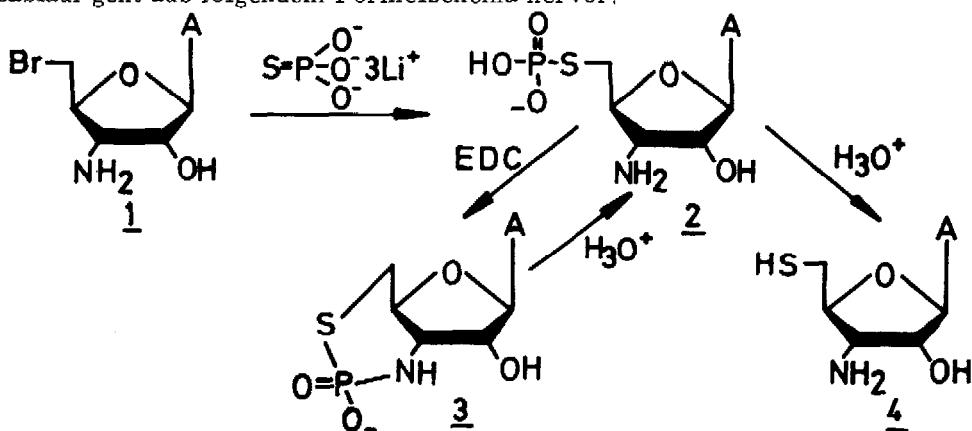
Die biologischen Eigenschaften des cAMP werden insbesondere durch Modifizierung des Cyclophosphatringes beeinflußt, wobei sich Veränderungen in der 3'-Position am stärksten bemerkbar machen (1).

Ausgehend vom 3'-Amino-3'-desoxyadenosin wurde kürzlich das 3'-Amido-3'-desoxy-Analogon des cAMP synthetisiert (2, 3). Diese Verbindung ist zwar hydrolysebeständiger (hinsichtlich der P-N-Bindung) als das 5'-Amido-Analoge des cAMP, doch wäre es vom biologischen und pharmakologischen Standpunkt wünschenswert, Amido-Derivate mit noch stabilerer Cyclophosphatstruktur zu haben (4). Durch den Ersatz von P=O durch P=S erhielt Jastorff et al. bei 5'Amido-Derivaten des cAMP eine bei pH 5 um etwa 40 % stabilere Verbindung (5).

Die Substitution des 5'-Sauerstoffs durch Schwefel sollte Verbindungen liefern, die stabiler sind als das 3'-Amido-3'-desoxyadenosin-3',5'-cyclophosphat, da das für die Hydrolyse der P-N-Bindung wichtige freie Elektronenpaar am Stickstoff teilweise abgezogen wird.

Unter Anwendung einer einfachen Bromierungsmethode für Aminonucleoside konnte Verbindung 3 durch einen Zweistufenprozeß relativ einfach synthetisiert werden.

Der Reaktionsablauf geht aus folgendem Formelschema hervor:



Das Bromierungsprodukt 1 kann direkt oder nach Überführung in die freie Base mit Trolithiumphosphorothioat umgesetzt werden (6). Die Cyclisierung des 3'-Amino-5'-thio-3',5'-didesoxyadenosinphosphats 2 erfolgte mit dem wasserlöslichen Carbodiimid 1-Äthyl-3-(3-dimethyl-

aminopropyl)-carbodiimid-Hydrogencarbonat (3) ($\text{EDC} \cdot \text{HCO}_3$).

3'-Amino-5'-thio-3',5'-didesoxyadenosinphosphat 2:

1.75 mMol 1 (575 mg) als freie Base werden mit 8 mMol (1.85 g) Trilithiumphosphorothioat in 130 ml Wasser für 16 Std. bei 45°C umgesetzt. Anschließend wird auf 500 ml verdünnt und der Ansatz auf eine DEAE-Sephadex-A 25-Säule (HCO_3^- -Form) gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde mit einem linearen Gradienten aus 0.01 M und 0.4 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat (pH 7.5) eluiert. Die Hauptfraktion wurde eingeengt und lyophilisiert. Man erhält etwa 380 mg 2 (47 % d. Th.) als bromidfreies Triäthylammoniumsalz.

5'-Thio-3'-amido-5',3'-didesoxyadenosin-3',5'-cyclophosphat 3:

0.71 mMol 2 (330 mg) werden mit einer Lösung aus 0.7 ml (4.5 mMol) EDC in 100 ml Wasser, die vorher durch Einleiten von CO_2 auf pH 8 eingestellt wurde, versetzt. Man röhrt 7 Std. bei 27°C und hält den pH-Wert durch Einleiten von CO_2 zwischen 7.3-7.6. Nach Verdünnen der Lösung und Chromatographie an DEAE-Sephadex, wie im obigen Ansatz, erhält man 90 mg 3 (28% d. Th). Die Struktur der Verbindungen 2 und 3 wurde bestimmt durch ^1H - und ^{31}P - NMR-Spektren, sowie durch chromatographischen Vergleich mit cAMP und 3'-Amido-3'-desoxy-cAMP.

Protonenentkoppelte ^{31}P -Spektren lieferten für 2 eine chemische Verschiebung von $\delta = + 15.9$ ppm und für 3 $\delta = + 18.0$ ppm (δ zu tiefem Feld von H_3PO_4) Werte, die die Struktur eindeutig bestätigen und mit Literaturwerten gut übereinstimmen (7). Das Protonenspektrum in D_2O liefert für H^1 der offenen Verbindung 2 ein Dublett bei $\delta = 6.2$ ppm und für 3 ein Singulett bei $\delta = 6.1$ ppm, welches ein eindeutiges Kriterium für das Vorliegen der Cyclophosphatstruktur in 3 ist. Durch die Einführung von Schwefel in die 5'-Position wurde 3 chemisch wesentlich stabiler als das 3'-Amido-3'-desoxy-cAMP-Analoge (2, 3). Nach über 48 Std. bei 37°C trat bei pH 5, 7 und 9 keine Hydrolyse ein. Bei pH 3 war die Verbindung erst nach 48 Std. vollständig hydrolysiert. Hydrolyse in 0.1 N HCl liefert quantitativ Verbindung 4, die durch DC, Nachweis der SH-Gruppe mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoësäure) und Reaktion mit Ninhydrin nachgewiesen wurde. Bei der Hydrolyse in 0.1 N HCl wird die P-N-Bindung wesentlich schneller gespalten als die P-S-Bindung. Verbindung 3 bindet kompetitiv um eine Zehnerpotenz schlechter an Protein-Kinasen aus Kaninchenmuskel als das 3'-Amido-analoge des cAMP (1, 8).

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Technologie-Programms des Bundesministeriums für Forschung und Technologie gefördert.

LITERATUR

- (1) N. Panitz, E. Rieke, M. Morr, K. G. Wagner, G. Roesler und M. Jastorff, *Eur. J. Biochem.*, 55, 415 (1975)
- (2) M. Morr, M.-R. Kula, G. Roesler und B. Jastorff, *Angew. Chem.*, 86, 308 (1974)
- (3) M. Morr, M.-R. Kula und L. Ernst, *Tetrahedron*, 31, 1619 (1975)
- (4) A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer und H. Hettler, *J. Org. Chem.*, 36, 3029 (1971)
- (5) B. Jastorff u. T. Krebs, *Chem. Ber.*, 105, 3192 (1972)
- (6) S. Akerfeldt, *Acta Chem. Scand.*, 16, 1897 (1962)
- (7) K. Haga, M. Kainosho und M. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 44, 460 (1971)
- (8) E. Rieke und J. Hoppe, persönliche Mitteilung