

Antonin Holy*) und Karl-Heinz Scheit

Synthese von 5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin, Uridylyl-(3'-5')-inosin, Uridylyl-(3'-5')-1-methyl-inosin und Uridylyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β -D-ribofuranosyl]-purin

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin,
Chemische Abteilung, Göttingen **)

(Eingegangen am 27. Mai 1966)

Die im Titel erwähnten Diribonucleosidphosphate (**21**, **16**, **17**, **18**) wurden nach bekannten Methoden dargestellt und einige ihrer Eigenschaften untersucht.

Im Zusammenhang mit dem Problem der Methylierung von Ribonucleinsäuren durch Diazomethan interessierte uns unter anderem die Frage der Methylierung von Inosin (**1**) in Oligonucleotiden durch Diazomethan. Als Modellsubstanz für die Untersuchung dieser Reaktion haben wir Uridylyl-(3'-5')-inosin (**16**) gewählt. Da bei der Methylierung von **1** mit Diazomethan 1-Methyl-inosin, 6-Methoxy-9-[β -D-ribofuranosyl]-purin und 7-Methyl-inosin zu erwarten waren^{1, 2)}, synthetisierten wir Uridylyl-(3'-5')-1-methyl-inosin (**17**) und Uridylyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β -D-ribofuranosyl]-purin (**18**) zum Vergleich. 7-Methyl-inosin war selbst bei pH 7.0 außerordentlich unbeständig³⁾, so daß die Darstellung eines entsprechenden Diribonucleosidphosphates nicht versucht wurde.

5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (**21**) synthetisierten wir, um die Hyperchromie dieser Verbindung bestimmen und mit der anderer Diribonucleosidphosphate vergleichen zu können.

Die Diribonucleosidphosphate wurden durch Kondensation von 2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-5'-O-acetyl-nucleosid-3'-phosphat mit einem 2'.3'-O-Äthoxymethylen-ribonucleosid unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid DCCI dargestellt⁴⁻⁶⁾.

1-Methyl-2'.3'-O-äthoxymethylen-inosin (**4**) und 6-Methoxy-9-[2'.3'-O-äthoxymethylen- β -D-ribofuranosyl]-purin (**5**) wurden durch Reaktion von 2'.3'-O-äthoxymethylen-inosin (**2**) mit Diazomethan in Methanol/Äther bei 0° bereitet. Diese Methylierung mußte unter Vermeidung eines größeren Überschusses an Diazomethan durchgeführt werden, da die Reaktionsprodukte mit Diazomethan weiter reagieren können.

*) Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslovakischen Akademie der Wissenschaften, Prag (ČSSR).

***) Anfragen können an diese Adresse gerichtet werden.

1) H. T. Miles, J. org. Chemistry **26**, 4761 (1961).

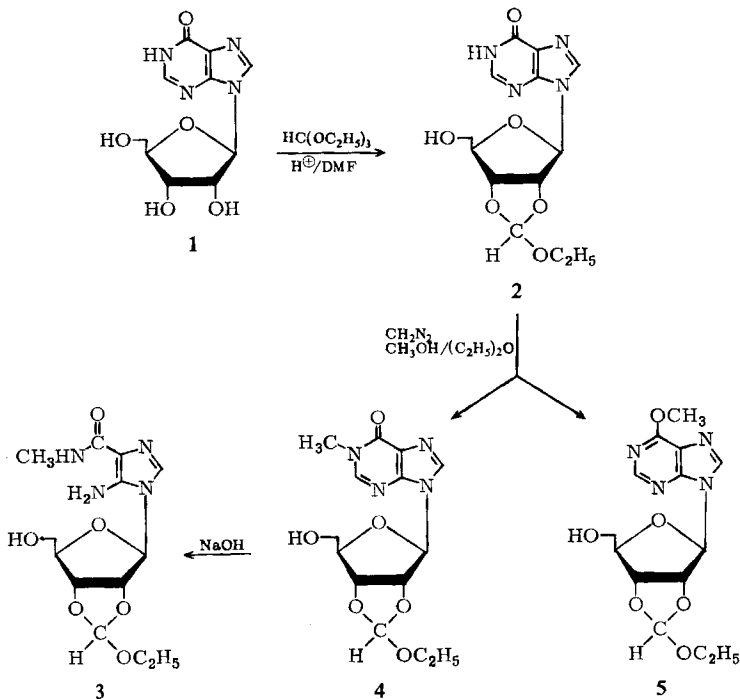
2) J. W. Jones und R. K. Robins, J. Amer. chem. Soc. **85**, 193 (1963).

3) Unveröffentlichte Ergebnisse.

4) J. Zemlicka, Chem. and Ind. **1964**, 581.

5) J. Smrt und S. Chladek, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31** (1966), im Druck.

6) J. Zemlicka, S. Chladek, A. Holy und J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31** (1966), im Druck.



Behandeln von **4** mit Alkali führte zur Ringöffnung der Nucleobase und Bildung des Imidazolderivates **3**^{7,8)}. Bei der Synthese von **17** konnten aber Bedingungen für die alkalische Hydrolyse der 5'-O-Acetylgruppe gefunden werden, wobei keine Spaltung des 1-Methyl-hypoxanthinringes eintrat.

Für die Synthese von 5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (**21**) benötigten wir das selektiv geschützte Nucleotid **11**.

Wir gingen von 5-Methyl-uridin (**6**)⁹⁾ aus, das in einer säurekatalysierten Reaktion mit Triäthylphosphit zu **7**¹⁰⁾ reagierte. Durch Behandeln von **7** mit Hexachloraceton erfolgte oxydative Cyclisierung¹¹⁾ zum 5-Methyl-uridin-2',3'-cyclophosphat (**8**), welches nach der Acetylierung zu **9** mit Pankreas-Ribonuclease zum Nucleosid-3'-phosphat **10** gespalten wurde. **10** reagierte mit Äthylvinyläther⁵⁾ unter saurer Katalyse quantitativ zur 2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-Verbindung **11**.

Die Synthese der Diribonucleosidphosphate bereitet keine Schwierigkeiten. Nach der alkalischen Hydrolyse wurden die teilweise geschützten Diribonucleosidphosphate **13**, **14**, **15** und **20** durch Anionenaustauscher-Chromatographie an DEAE(Diäthylamino-äthyl)-Cellulose in reiner Form als Triäthylammoniumsalze in Ausbeuten von 40–60% isoliert. Die Diribonucleosidphosphate **16**, **17**, **18** und **21** wurden nach Abspalten der

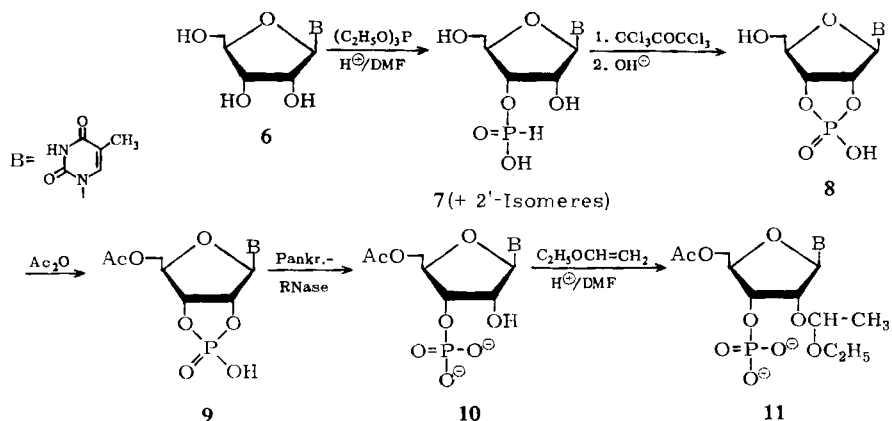
7) E. Shaw, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3899 (1958).

8) C. M. Baugh und E. N. Shaw, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **114**, 213 (1966).

9) Die Darstellung von 5-Methyl-uridin wird in Kürze beschrieben werden.

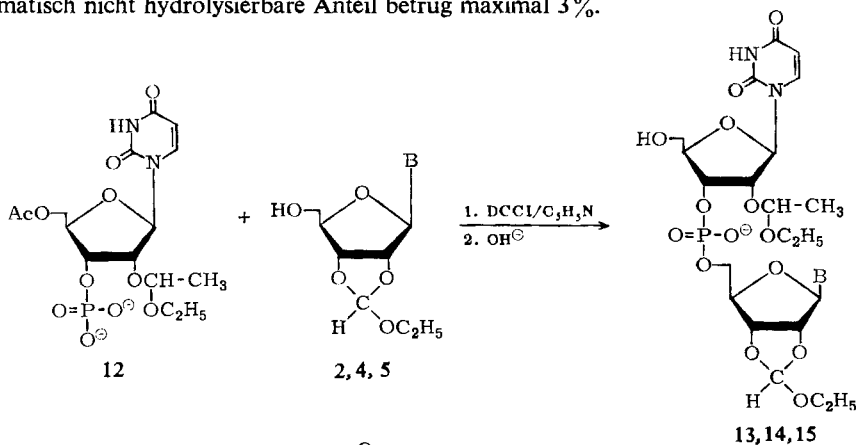
10) A. Holy und F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31** (1966), im Druck.

11) A. Holy und J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31** (1966), im Druck.

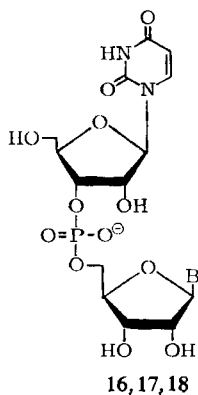


säurelabilen Schutzgruppen mit 10-proz. Essigsäure durch präparative Papierchromatographie im Lösungsmittel A isoliert.

Alle dargestellten Diribonucleosidphosphate wurden durch Pankreas-Ribonuclease zu den entsprechenden Nucleosid-3'-phosphaten und Nucleosiden gespalten. Der enzymatisch nicht hydrolysierbare Anteil betrug maximal 3%.



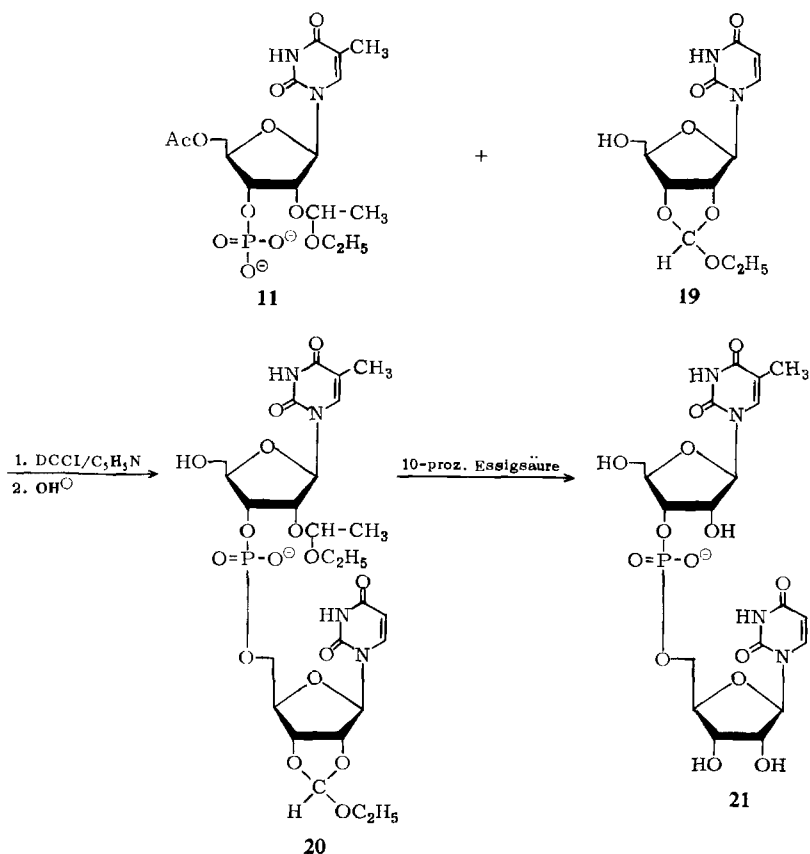
10-proz. Essigsäure



2, 13, 16: B = Hypoxanthinyl-(9)

4, 14, 17: B = 1-Methyl-hypoxanthinyl-(9)

5, 15, 18: B = 6-Methoxy-purinylyl-(9)



Von den Diribonucleosidphosphaten **16**, **17**, **18**, **21** und Uridylyl-(3'-5')-uridin⁵⁾ wurde die bei der enzymatischen Spaltung im UV-Spektrum auftretende Hyperchromie bestimmt. Es war uns nicht möglich, in der Literatur bereits beschriebene Hyperchromieangaben^{12,13,14)} zu bestätigen. Die von uns gefundenen Werte waren so niedrig, daß sie zum Teil im Bereich des Meßfehlers lagen.

Tab. 1. Hyperchromie*) von Diribonucleosidphosphaten

Uridylyl-(3'-5')-uridin	3.0 [%]
Uridylyl-(3'-5')-inosin (16)	4.0 [%]
Uridylyl-(3'-5')-1-methyl-inosin (17)	2.0 [%]
Uridylyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β -D-ribofuranosyl]-purin (18)	3.0 [%]
5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (21)	2.0 [%]

*) Die Hyperchromie wurde nach der Beziehung $\frac{\Delta A}{A_{\max}} \cdot 100$ [%] berechnet; ΔA = Differenz der optischen Dichte bei λ_{\max} vor und nach der enzymatischen Hydrolyse. λ_{\max} : Wert der optischen Dichte bei λ_{\max} nach beendeter enzymatischer Hydrolyse.

¹²⁾ R. Thedford, M. H. Fleysler und R. H. Hall, J. med. pharmac. Chem. **8**, 486 (1965).

¹³⁾ A. M. Michelson, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **55**, 841 (1962).

¹⁴⁾ A. M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press Inc., New York, N. Y. 1963.

Eine umfassende Untersuchung der Hyperchromie von Dinucleosidphosphaten und Oligonucleotiden ist begonnen worden.

Wir danken Herrn Prof. F. Cramer für die wohlwollende Förderung der Arbeit und Fräulein H. Stöters für fleißige und geschickte Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Bemerkungen: Für die Säulenchromatographie wurde ein LKB-Fraktions-sammler mit einem Uvicord UV-Analysator verwendet. Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Fa. Reichert, Österreich) bestimmt und waren nicht korrigiert. UV-Spektren wurden mit einem Zeiss PM QII und einem Cary 14 Spektralphotometer aufgenommen.

Papierchromatographie: Papiere: SS 2043 b (gewaschen), Whatman 3 MM.

Lösungsmittel:

Propanol-(2) : $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz.}}$: H_2O = 7 : 1 : 2 (A)

Äthanol : 1 *m* $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ = 7 : 3 (B)

n-Butanol : $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$: H_2O = 5 : 2 : 3 (C)

Elektrophorese: Papier: SS 2043 b (gewaschen), Puffer: 0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogen-carbonat pH 7.5. Die Papierelektrophorese wurde bei 17 Volt/cm durchgeführt.

Enzymatische Hydrolyse: 2–3 mg Substrat wurden in 0.2 ccm 0.25 *m* Trispuffer pH 8.0 gelöst, 0.5 mg Pankreas-Ribonuclease zugegeben und die Lösung 6 Stdn. bei 37° inkubiert.

Hyperchromie: 3 ccm einer Lösung des Diribonucleosidphosphates (in 0.05 *m* Trispuffer pH 8.0) der optischen Dichte 0.5–0.6 bei λ_{max} wurden in einer Küvette mit 10 λ Phosphodiesterase (snake venom, 200 Enzymeinheiten) bei 37° inkubiert und die Änderung der optischen Dichte im UV bei λ_{max} verfolgt.

2'.3'-O-Äthoxymethylen-inosin (2): 2.68 g (10 mMol) *Inosin* wurden in 20 ccm Dimethylformamid, 10 ccm *Orthoameisensäure-triäthylester* und 0.1 ccm 3.7 *m* HCl in Dimethylformamid unter Schütteln gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen. Man gab dann 200 ccm 2 *m* NH_4OH zu, engte nach 2 Stdn. bei Raumtemp. bei 15 Torr/40° ein und trocknete den Rückstand durch Abdestillieren von Pyridin unter den gleichen Bedingungen. Der Rückstand, in 30 ccm Chloroform gelöst, wurde unter Rühren in 300 ccm Äther eingetropfelt, der ausgefallene Niederschlag abgesaugt, mit Äther gewaschen und bei 0.5 Torr über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausb. 2.80 g (87%) chromatographisch reines, amorphes Produkt. Schmp. 125°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6$ (324.3) Ber. C 48.14 H 4.97 N 17.27 Gef. C 48.30 H 5.27 N 17.45

UV (Wasser, pH 7.0): λ_{max} 251 $\text{m}\mu$ (ϵ_{max} $12 \cdot 10^3$), λ_{min} 225 $\text{m}\mu$; $A_{250}/A_{260} = 1.72$, $A_{280}/A_{260} = 0.25$.

Methylierung von 2 mit Diazomethan: 5.25 g (15 mMol) **2** in 150 ccm Methanol wurden bei 0° mit 215 ccm 0.71 *m* *Diazomethan* in Äther versetzt. Die Reaktion war nach 15 Min. quantitativ, wie Dünnschichtchromatographie an Silikagel in Chloroform/Methanol (9 : 1) zeigte. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 15 Torr/30° eingengt und durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silikagel in Chloroform/Methanol (97 : 3) getrennt. Die mittlere Zone (R_F 0.40) wurde mit 100 ccm Methanol eluiert, bei 15 Torr/30° eingengt und aus 50 ccm Chloroform durch 300 ccm Petroläther (40–60°) in farblosen Flocken gefällt. Ausb. 2.90 g (40%) chromatographisch reines *1-Methyl-2'.3'-O-äthoxymethylen-inosin (4)* (nach Trocknen bei 40°/0.5 Torr über P_2O_5).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6$ (338.3) Ber. C 49.70 H 5.36 N 16.56 Gef. C 50.66 H 5.45 N 16.32

UV (Wasser, pH 7.0): λ_{max} 251 $\text{m}\mu$, λ_{min} 238 $\text{m}\mu$; $A_{250}/A_{260} = 1.17$, $A_{280}/A_{260} = 0.40$.

Aus der Zone mit R_F 0.83 wurden in gleicher Weise 1.50 g (30%) 6-Methoxy-9-[2'.3'-O-äthoxymethylen- β -D-ribofuranosyl]-purin (5) gewonnen.

$C_{14}H_{18}N_4O_6$ (338.3) Ber. C 49.70 H 5.36 N 16.56 Gef. C 50.24 H 5.70 N 16.71

UV (Wasser, pH 7.0): λ_{\max} 248 m μ , λ_{\min} 232 m μ ; $A_{250}/A_{260} = 1.45$, $A_{280}/A_{260} = 0.16$.

4-Amino-5-methylaminoformyl-3-[2'.3'-O-äthoxymethylen- β -D-ribofuranosyl]-imidazol (3): Eine Lösung von 370 mg (0.77 mMol) 4 in 5 ccm 1 *m* NaOH wurde eine Stde. bei 100° gehalten, abgekühlt und nach Zugabe von 50 ccm Wasser mit Pyridinium-Dowex 50X8 neutralisiert. Die Suspension wurde dann abgesaugt und das Filtrat bei 40°/15 Torr eingengt. Nach der präparativen Dünnschichtchromatographie an Silikagel in Chloroform/Methanol (9:1) wurde die Hauptzone mit 100 ccm Methanol eluiert, das Eluat bei 30°/15 Torr eingengt und der Rückstand in 10 ccm Chloroform gelöst. Das amorphe, farblose Produkt wurde mit 100 ccm Petroläther (40–60°) ausgefällt. Ausb. 187 mg (70%) reines Monohydrat.

$C_{13}H_{20}N_4O_6 \cdot H_2O$ (346.4) Ber. C 45.06 H 6.40 N 16.17

Gef. C 45.01 H 6.35 N 16.09 Mol.-Gew. 328 (massenspekt.)

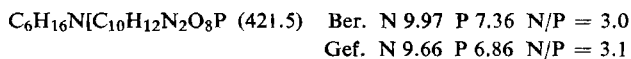
5-Methyl-uridin-3'-phosphit (7): 3.9 g (15 mMol) 5-Methyl-uridin (6) in 30 ccm Dimethylformamid und 10 ccm Triäthylphosphit wurden nach Zugabe von 3 ccm 3.3 *m* Chlorwasserstoff in Dimethylformamid (10 mMol) über Nacht bei Raumtemp. geschüttelt. Nach Zusatz von 3 ccm Triäthylamin engte man das Reaktionsgemisch bei 30°/0.5 Torr ein, nahm den Rückstand mit 100 ccm 3 *m* NH_4OH auf und engte die Lösung nach 2 Stdn. bei Raumtemp. wieder ein. Der Rückstand wurde, in Wasser gelöst, auf eine DEAE-Säule (110 \times 4.5 cm, HCO_3^-) gebracht. Die Säule wurde zuerst mit 3 *l* Wasser, dann mit einer Pufferlösung steigender Konzentration (3 *l* Wasser, 3 *l* 0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat pH 7.5) eluiert. Die gewünschte Substanz wurde bei der Pufferkonzentration 0.09–0.10 Mol/l eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingengt (35°/15 Torr), Reste von Triäthylamin durch mehrmaliges Abdestillieren von Wasser entfernt. Das Triäthylammoniumsalz wurde in wäbr. Lösung durch Pyridinium-Dowex 50X8 und Neutralisation mit konz. Ammoniak in das Ammoniumsalz übergeführt. Nach Einengen der Lösung wurde der Rückstand in 30 ccm Methanol gelöst und das Ammoniumsalz mit 200 ccm Äther gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und über P_2O_5 bei 0.5 Torr getrocknet: 2.60 g (51%) chromatographisch sauberes Ammoniumsalz des 5-Methyl-uridin-3'-phosphits (7).

$NH_4[C_{10}H_{14}N_2O_8P]$ (339.3) Ber. N 12.39 P 9.14 Gef. N 12.37 P 9.15

UV (Wasser, pH 7.0): λ_{\max} 267 m μ ; $A_{250}/A_{260} = 0.65$, $A_{280}/A_{260} = 0.72$.

5-Methyl-uridin-2'.3'-cyclophosphat (8): Eine Lösung von 2.50 g (7.4 mMol) Ammoniumsalz von 7 in 30 ccm Dimethylformamid wurde bei Eiskühlung unter Rühren mit 15 ccm Hexachloraceton versetzt und dann bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Den ausgefallenen Niederschlag zentrifugierte man ab, wusch mit 10 ccm Dimethylformamid und engte die vereinigten Dimethylformamidlösungen bei 40°/0.5 Torr ein. Zum Rückstand gab man 100 ccm 3 *n* NH_4OH und schüttelte 4 Stdn. Nach der Extraktion mit Äther (2 \times 50 ccm) wurde die wäbr. Phase bei 35°/15 Torr eingengt, der Rückstand in einem Gemisch von 10 ccm 3 *n* NH_4OH , 10 ccm Dimethylformamid und 25 ccm tert.-Butylalkohol gelöst und nach Zugabe von 4.0 g Dicyclohexylcarbodiimid 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Wie Chromatographie in Lösungsmittel A zeigte, enthielt das Reaktionsgemisch nur noch 5-Methyl-uridin-2'.3'-cyclophosphat. Die Mischung wurde dann zur Hälfte eingengt, mit 50 ccm Wasser verdünnt und mit Äther (2 \times 20 ccm) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (110 \times 4.5 cm, HCO_3^-) gegeben, zuerst mit 3 *l* Wasser, dann mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (pH 7.5) (3 *l* Wasser, 3 *l* 0.1 *m* Puffer-Lösung) eluiert. Die Hauptfraktion (0.08–0.10 *m*) wurde eingengt und das

Triäthylamin durch Abdestillieren von Wasser entfernt. Der gummiartige Rückstand wurde in 10 ccm Äthanol gelöst und das Triäthylammoniumsalz mit 200 ccm Äther gefällt. Ausb. 2.5 g (80%) *Triäthylammoniumsalz von 8*. Das Produkt ist chromatographisch (Lösungsmittel A, B) und elektrophoretisch einheitlich.



5-Methyl-5'-O-acetyl-uridin-3'-phosphat (10): 2.40 g (5.7 mMol) *5-Methyl-uridin-2'.3'-cyclophosphat (8)* (*Triäthylammoniumsalz*) wurden in 50 ccm Pyridin/25 ccm *Acetanhydrid* über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Wie die Chromatographie in System B zeigte, war die Reaktion dann quantitativ. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°/0.5 Torr eingengt, zweimal je 50 ccm Pyridin unter denselben Bedingungen abdestilliert und der zurückbleibende Sirup unter Eiskühlung in 75 ccm Pyridin/Wasser/Methanol (1 : 1 : 1) gelöst. Nach 2 Stdn. bei Raumtemp. wurde die Lösung eingengt (30°/0.5 Torr), mit 100 ccm 10-proz. wäbr. Pyridin aufgenommen und unter Eiskühlung mit 3 *m* NH₄OH auf pH 8.0 gebracht. Dann wurden 50 mg Pankreas-RNase zugegeben und die Lösung 10 Stdn. bei 40° unter pH-Kontrolle inkubiert. Das Hydrolysat filtrierte man über eine Pyridinium-Dowex(50X8)-Säule, wusch mit 200 ccm 30-proz. Pyridin und engte die Filtrate bei 25°/0.5 Torr auf 50 ccm ein. Diese Lösung wurde mit NH₄OH bei 0° auf pH 8.0 gebracht und zur Trockne eingedampft (25°/0.5 Torr). Der Rückstand wurde mit 300 ccm Äthanol/Äther (1 : 1) geschüttelt; der ausgefallene farblose, amorphe Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und über P₂O₅ bei 0.5 Torr getrocknet. Ausb. 2.20 g (84%) chromatographisch reines *Ammoniumsalz von 10* (Mol.-Gew. nach UV-Spektrum 460).



UV (pH 2.0): λ_{max} 267 m μ ; $A_{250}/A_{260} = 0.68$, $A_{280}/A_{260} = 0.67$.

5-Methyl-2'-O-[1-äthoxy-äthyl]-5'-O-acetyl-uridin-3'-phosphat (11): Ein Gemisch von 2.15 g (4.7 mMol) *Ammoniumsalz von 10* (Mol.-Gew. 460), 8 ccm Dimethylformamid und 4 ccm *Äthylvinyläther* wurde bei -60° mit 1.0 ccm Trifluoressigsäure versetzt und 4 Stdn. bei 0° gerührt. Dann wurde wieder auf -60° abgekühlt, 3 ccm Triäthylamin zugegeben und bei 25°/0.5 Torr eingengt. Den sirupösen Rückstand löste man in 15 ccm Methanol und ließ unter Rühren in eine Lösung von 2.5 g trifluoressigsäurem Barium in 220 ccm Methanol/Äther (1 : 10) eintropfen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, dreimal mit je 50 ccm Methanol/Äther (1 : 1) gewaschen und bei 25°/0.5 Torr über P₂O₅ getrocknet. Nach der Mol.-Gew.-Bestimmung (pH 2.0, $\epsilon_{260} = 8.4 \cdot 10^3$) ist das *Bariumsalz des geschützten Phosphates* 80-proz.; Ausb. 2.42 g (70%) chromatographisch sauberes Produkt.



UV (pH 2.0): λ_{max} 267 m μ ; $A_{250}/A_{260} = 0.68$, $A_{280}/A_{260} = 0.67$.

Synthese von Diribonucleosidphosphaten

Allgemeine Vorschrift: 2 mMol *geschütztes Nucleotid* (als Bariumsalz) wurden in 10 ccm 50-proz. wäbr. Pyridin über eine Pyridinium-Dowex(50X8)-Säule (20 × 1.5 cm) filtriert und mit 100 ccm 50-proz. wäbr. Pyridin bei 4° eluiert. Das Eluat wurde bei 25°/0.5 Torr unter Zugabe von Pyridin eingengt und zum Rückstand eine Pyridin-Lösung von 6 mMol *geschützten Nucleosides* gegeben. Das Gemisch wurde dann durch Kodestillation mit insgesamt 250 ccm Pyridin bei 25°/0.5 Torr getrocknet, in 10 ccm Pyridin gelöst und 2.06 g (10 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* zugegeben. Nach 4--5 Tagen bei Raumtemp. gab man 20 ccm 50-proz. wäbr. Pyridin, das 1 ccm Triäthylamin enthielt, zu, schüttelte 2 Stdn. bei

Raumtemp., gab dann 100 ccm Wasser zu und extrahierte die Mischung zweimal mit je 50 ccm Äther. Die wäbr. Phase wurde bei 35°/15 Torr auf ungefähr 20 ccm eingengt, das gleiche Vol. konz. Ammoniak zugegeben und das Gemisch 2 Stdn. auf 50° erhitzt *). Diese Lösung wurde bei 35°/15 Torr auf ein kleines Vol. eingengt und dann auf eine DEAE-Celulose-Säule (110×2.5 cm, HCO₃⁻-Form) aufgetragen. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, bis die UV-Absorption des Filtrates vernachlässigbar war. Dann folgte Elution mit einem linearen Gradienten von Triäthylammoniumhydrogencarbonat pH 7.5 (2.5 l Wasser im Mischgefäß, 2.5 l 0.2m Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Lösung im Vorratsgefäß) bei einer Tropfgeschwindigkeit von 2.5 ccm/Min. Fraktionen, welche das Dinucleosidphosphat enthielten, wurden bei 36°/15 Torr eingengt. Das restliche Triäthylammoniumhydrogencarbonat entfernte man durch Abdestillieren von Wasser und machte den Rückstand durch Kodestillieren mit Äthanol, das wenig Triäthylamin enthält, wasserfrei. Das zurückbleibende Triäthylammoniumsalz wurde aus 10 ccm Äthanol mit 300 ccm Petroläther/Äther (1:1) gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Petroläther/Äther gewaschen und bei 0.5 Torr über P₂O₅ getrocknet. Die Ausb. wurde durch UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung der Triäthylammoniumsalze ermittelt. Die säurelabilen Schutzgruppen wurden durch 4stdg. saure Hydrolyse in 10-proz. Essigsäure bei Raumtemp. abgespalten (50 mg Triäthylammoniumsalz in 0.5 ccm 10-proz. Essigsäure.)

Die Diribonucleosidphosphate wurden durch präparative Papierchromatographie im Lösungsmittel A an Whatman 3MM-Papier isoliert. Die Substanzen wurden mit verd. Ammoniak pH 9 vom Papier eluiert und die wäbr. Lösungen lyophilisiert. Die Reinheit der Verbindungen wurde durch enzymatische Hydrolyse mit Pankreas-Ribonuclease geprüft.

Uridyl-(3'-5')-inosin (16): Aus **12** und **2** wurde das teilweise geschützte Dinucleosidphosphat **13** mit 60-proz. Ausb., bez. auf eingesetztes **12**, erhalten. Durch saure Hydrolyse von **13** entstand **16** in 79-proz. Ausb. Die Hydrolyse durch Pankreas-Ribonuclease erfolgte zu 97%, Verhältnis Uridin-3'-phosphat : Inosin = 1 : 1.05.

Uridyl-(3'-5')-1-methyl-inosin (17): Aus **12** und **4** wurde **14** in einer Ausb. von 39%, bez. auf **2**, dargestellt. **14** führte nach saurer Hydrolyse in 70-proz. Ausb. zu **17**. Enzymatische Hydrolyse von **17** mit Pankreas-Ribonuclease erfolgte zu 98%; Verhältnis Uridin-3'-phosphat : 1-Methyl-inosin = 1 : 0.90.

Uridyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β-D-ribofuranosyl]-purin (18): Aus **12** und **5** wurde **15** mit einer Ausbeute von 50% dargestellt**). Durch saure Hydrolyse von **15** wurde **18** in 80-proz. Ausb. erhalten. Enzymatische Spaltung mit Pankreas-Ribonuclease erfolgte zu 99%; Verhältnis Uridin-3'-phosphat : 6-Methoxy-purinribosid = 1 : 0.98.

5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (21): Durch Kondensation von **11** mit **19** entstand **20** in einer Ausb. von 45%, bez. auf **11**. Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen führte in 73-proz. Ausb. zu **21**. Enzymatische Spaltung mit Pankreas-Ribonuclease erfolgte zu 97%; Verhältnis 5-Methyl-uridin-3'-phosphat : Uridin = 1 : 1.1.

Tab. 2. UV-Spektren der Diribonucleosidphosphate (in 0.05m Phosphat-Puffer pH 7.0)

Verbindung	λ _{max} [mμ]	λ _{min} [mμ]	O. D. ₂₅₀ /O. D. ₂₆₀	O. D. ₂₈₀ /O. D. ₂₆₀
Uridyl-(3'-5')-uridin	260	230	0.77	0.34
Uridyl-(3'-5')-inosin (16)	251	225	1.15	0.28
Uridyl-(3'-5')-1-methyl-inosin (17)	255	233	0.98	0.45
Uridyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β-D-ribofuranosyl]-purin (18)	252	225	1.11	0.25
5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (21)	264	233	0.70	0.53

*) Bei der Synthese von Uridyl-(3'-5')-1-methyl-inosin wurde die Abspaltung der 5'-O-Acetylgruppe in 3m NH₄OH 10 Stdn. bei Raumtemp. ausgeführt. Unter diesen Bedingungen erfolgte keine Zersetzung des 1-Methyl-inosins.

**) Diese Kondensation wurde in einem Drittel der in der allgemeinen Vorschrift angegebenen Mengen durchgeführt.

Tab. 3. Papierchromatographie und Elektrophorese

Verbindung	Papierchromatographie			Elektrophorese *)
	A	[R _F] B	C	
Uridin	0.42	—	0.45	—
2',3'-O-Äthoxymethylen-uridin	0.75	—	—	—
Inosin (1)	0.35	0.50	—	—
2',3'-O-Äthoxymethylen-inosin (2)	0.68	—	—	—
1-Methyl-inosin	0.45	—	—	—
1-Methyl-2',3'-O-äthoxymethylen-inosin (4)	0.74	—	—	—
6-Methoxy-9-[β-D-ribofuranosyl]-purin	0.80	—	—	—
6-Methoxy-9-[2',3'-O-äthoxymethylen-β-D-ribofuranosyl]-purin (5)	0.88	—	—	—
Uridin-(2')3'-phosphat	0.08	0.30	0.20	1.00
Uridin-2',3'-cyclophosphat	0.30	0.57	0.20	0.67
5-Methyl-uridin (6)	0.58	—	—	—
5-Methyl-uridin-(2')3'-phosphit (7)	0.51	—	—	0.62
5-Methyl-uridin-2',3'-cyclophosphat (8)	0.45	0.65	—	0.65
5-Methyl-uridin-3'-phosphat	0.15	—	—	0.90
5-Methyl-5'-O-acetyl-uridin-2',3'-cyclophosphat (9)	—	0.73	—	0.60
5-Methyl-5'-O-acetyl-uridin-3'-phosphat (10)	0.21	0.48	—	0.85
5-Methyl-2'-O-[1-äthoxy-äthyl]-5'-O-acetyl-uridin-3'-phosphat (11)	0.33	0.70	—	—
2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-uridylyl-(3'-5')-[2',3'-O-äthoxymethylen-inosin] (13)	0.50	0.74	—	0.42
2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-uridylyl-(3'-5')-[1-methyl-2',3'-O-äthoxymethylen-inosin] (14)	0.55	—	—	0.32
2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-uridylyl-(3'-5')-[6-methoxy-9-(2',3'-O-äthoxymethylen-β-D-ribofuranosyl)-purin] (15)	0.70	—	—	0.35
2'-O-[1-Äthoxy-äthyl]-5-methyl-uridylyl-(3'-5')-[2',3'-O-äthoxymethylen-uridin] (20)	0.65	—	—	0.43
Uridylyl-(3'-5')-uridin	0.16	0.45	0.18	0.47
Uridylyl-(3'-5')-inosin (16)	0.20	0.38	0.17	0.48
Uridylyl-(3'-5')-1-methyl-inosin (17)	0.25	0.48	0.20	0.35
Uridylyl-(3'-5')-6-methoxy-9-[β-D-ribofuranosyl]-purin (18)	0.36	0.60	0.34	0.40
5-Methyl-uridylyl-(3'-5')-uridin (21)	0.26	0.50	0.23	0.47

*) Bezogen auf Uridin-(2')3'-phosphat.

[238/66]