

Bernd Jastorff und Hans Hettler

Nucleotid-Analoga von 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosiden¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
(Eingegangen am 9. Juli 1969)

Die Synthese von Monoestern und Diestern der 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin- und 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin-*N*-phosphate (**6** bzw. **4**) als Modells-substanzen in der Ribo- und in der Desoxyribo-Reihe werden beschrieben. Die freien Phosphorsäureamide sind nur als Dianionen (**7a**, **b**) analytisch faßbar. — Thymidylyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidin (**13**) wurde als Modell für eine Verbindung mit Internucleotid-P—N-Verknüpfung dargestellt.

In die Untersuchungen über modifizierte Nucleoside und ihr Verhalten im Stoffwechsel sind auch 3'- und 5'-Amino-nucleoside miteinbezogen worden.

Die Prüfung von 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin auf mögliche antivirale Aktivität brachte negative Resultate²⁾, während die Anti-Tumorwirkung der Verbindung 3'-Amino-3'-desoxy-adenosin gesichert zu sein scheint³⁾.

Wege zur chemischen Synthese von 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosiden (**1**) wurden verschiedentlich angegeben^{4,5,6)}; die am Stickstoff phosphorylierten Nucleotid-Analogen scheinen aber bisher nicht untersucht worden zu sein.

Aminodesoxynucleosid-*N*-phosphate **7** (I. Mitteil.¹⁾) und ihre Monoester **6** kommen als Substrate für Phosphoesterasen in Frage, während Oligomere mit P—N-Verknüpfung als potentielle Templates für polymerisierende Enzyme interessant sein können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese solcher Modells-substanzen für enzymatische Untersuchungen, insbesondere die Darstellung von Dinucleosidphosphaten mit P—N-Bindung.

Die Darstellung der Phosphorsäureamide **7** schloß sich an die Verfahren an, die zu den analogen Phosphatestern führen. Da aber die Reaktivität einer Aminogruppe den üblichen Phosphorylierungsmitteln gegenüber erheblich größer ist als die der sekundären Hydroxygruppen in Nucleosiden, konnte auf den Schutz dieser Funktionen zunächst verzichtet werden.

In der Desoxyribose-Reihe gingen wir von 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin (**1a**)⁴⁾ aus, in der Ribose-Reihe wurde 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin (**1b**) verwendet, das aus seinem Tosylat⁵⁾ durch Behandlung mit basischem Ionenaustauscher gewonnen wird.

¹⁾ Phosphoamide der Nucleoside, II; I. Mitteil.: B. Jastorff und H. Hettler, Tetrahedron Letters [London] **30**, 2543 (1969).

²⁾ A. R. Diwan, R. K. Robins und W. H. Prusoff, Experientia [Basel] **25**, 98 (1969).

³⁾ J. T. Truman und H. Klenow, Mol. Pharmacol. **4**, 77 (1968).

⁴⁾ J. P. Horwitz, A. J. Tomson, J. A. Urbanski und J. Chua, J. org. Chemistry **27**, 3045 (1962).

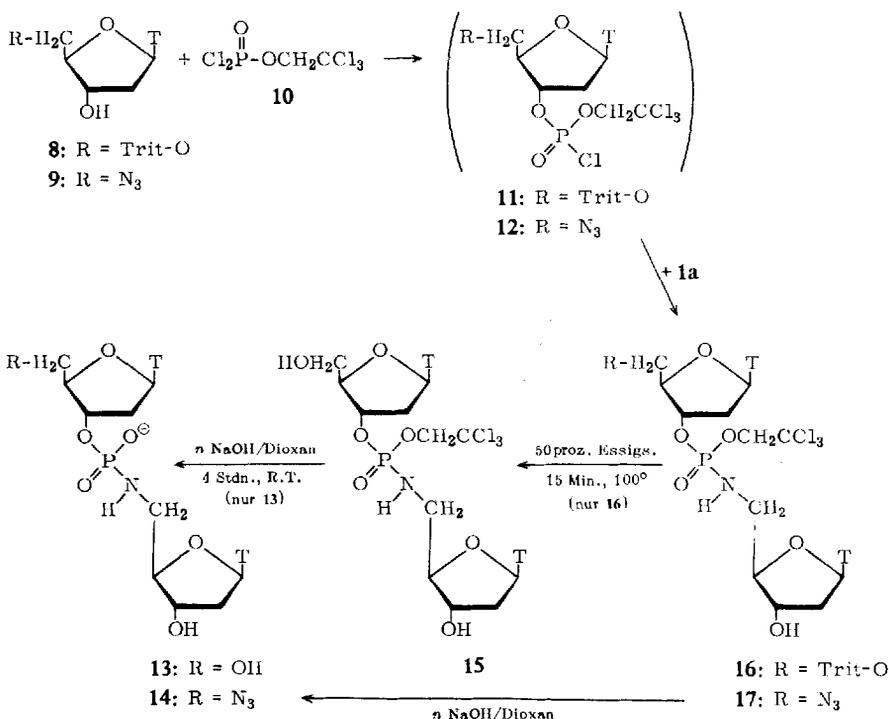
⁵⁾ R. R. Schmidt, U. Schleuz und D. Schwille, Chem. Ber. **101**, 590 (1968).

⁶⁾ W. Jahn, Chem. Ber. **98**, 1705 (1965).

Im ganzen pH-Bereich, der für enzymatische Reaktionen in Frage kommt, d. h. pH 6.5–10, erwies sich **7** als labil. Ebenso führten Versuche zur reduktiven Abspaltung der Trichloräthylgruppe in **6a1** und **6b1** mit Zink unter verschiedenen Bedingungen⁸⁾ immer zu **1a** bzw. **1b** zurück. Offenbar muß das Dianion von **7** vorliegen, um die Spezies wenigstens analytisch (d. h. dünnschichtchromatographisch und elektro-phoretisch) nachweisen zu können.

Nach Spaltung des Phosphorsäure-[*p*-nitro-phenylester]-amids **6a3** mit 1 *n* NaOH im Einschlußrohr bei 100°¹⁰⁾ läßt sich das Phosphorsäureamid **7a** elektrophoretisch und chromatographisch nachweisen. Dasselbe Produkt entsteht bei der Entfernung der Nitrobenzylschutzgruppe aus **4a2**¹³⁾ in Phosphatpuffer pH 11/Äthanol (1 : 1), und entsprechend läßt sich **7b** bei der Hydrogenolyse von **4b2** nachweisen.

Die erhöhte Reaktivität der 5'-Aminogruppe in den Aminonucleosiden **1a** und **1b** – verglichen mit OH-Gruppen von Nucleosiden – macht die Verknüpfung zu Dinucleosidphosphat-Analogen **13** mit P–N-Bindung in der Desoxy-Reihe relativ einfach. Es genügt, 5'-*O*-Trityl-thymidin (**8**)¹⁴⁾ mit Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthyl-ester]-dichlorid (**10**)¹⁵⁾ zu kondensieren und – ohne das Produkt **11** zu isolieren – mit 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin (**1a**) umzusetzen und dann das Reaktionsprodukt **16** mittels präparativer Schichtchromatographie abzutrennen.



¹³⁾ L. Zervas und I. Dilaris, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5354 (1955).

¹⁴⁾ P. T. Gilham und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **81**, 4647 (1959).

¹⁵⁾ W. Gerrard, W. J. Green und R. J. Phillips, J. chem. Soc. [London] **1954**, 1148.

Die Abspaltung der Tritylgruppe durch Essigsäurebehandlung und nachfolgende Verseifung der Trichloräthylestergruppe (durch 1*n* NaOH in Dioxan bei Raumtemp.) führen dann zum Thymidyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidin (**13**).

Führt man die Synthese ausgehend von 5'-Azido-5'-desoxy-thymidin (**9**) anstelle von **8** durch, so erhält man das 5'-Azido-5'-desoxy-thymidyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidin (**14**) (über eine zu **15** analoge Diesteramidstufe). Damit bietet sich die Möglichkeit, nach Reduktion der Azidogruppe in **14** zur Aminogruppe weitere Kondensationschritte unter P-N-Verknüpfung anzuschließen.

Substrateignung des 5'-Amino-5'-desoxy-adenosins (**1b**)

1b wird zwar vom Enzym Adenosin-Desaminase als Substrat angenommen¹⁶⁾, reagiert aber erheblich langsamer¹⁷⁾. Gegenüber dem Enzym Adenosinkinase¹⁸⁾ wirkt **1b** als kompetitiver Inhibitor.

Enzymatisches Verhalten der Phosphorsäuremonoester-amide und der Dinucleosidphosphate mit P-N-Bindung

Die Schlangengift-Phosphodiesterase¹²⁾ spaltet — wie erwähnt — Phosphorsäuremonoester-amide vom Typ **6** sowie Dinucleosidphosphate vom Typ **13**. Die Spaltung des *N*-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]-phosphorsäure-[*p*-nitro-phenylester]-amids (**6a3**) wurde spektralphotometrisch bei 400 m μ verfolgt¹⁹⁾. Es wird mit einem Drittel der Geschwindigkeit des Standards Thymidin-5'-[*p*-nitro-phenylphosphat]²⁰⁾ hydrolysiert.

Phosphodiesterase aus Kalbsmilz¹²⁾ spaltet das Thymidyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidin (**13**) zum Thymidin-3'-phosphat und 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin (**1a**). Diese Reaktion verläuft siebenmal langsamer als die Spaltung des entsprechenden Thymidyl-(3'-5')-thymidins.

Herrn Prof. Dr. F. Cramer danken wir für großzügige Unterstützung. Herrn Dr. H. M. Schiebel sind wir für die Aufnahme und Analyse von NMR- und Massenspektren zu großem Dank verpflichtet. Herr F. Tlatlik hat mit großem Eifer und Geschick zu der Arbeit beigetragen.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Bemerkungen: Die UV-Spektren wurden im Spektralphotometer Cary 14 gemessen, die kinetischen Messungen erfolgten entweder im Cary 14 oder im Gerät Gilford-2000 (Registrierendes Spektralphotometer mit Beckman DU-Optik). Die NMR-Spektren wurden mit dem Gerät Varian Modell HA-100, die Massenspektren teils mit einem CH-4-Gerät der Firma Atlas-Varian-MAT, teils mit einem MS-9-Gerät der Firma AEI jeweils bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen. Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind nicht korrigiert.

¹⁶⁾ A. Bloch, M. J. Robins und J. R. McCarthy, J. med. Chem. **10**, 908 (1967).

¹⁷⁾ A. Bloch et al.¹⁶⁾ geben an, die Reaktion mit **1b** verlaufe 250mal langsamer als mit Adenosin. Unsere Messungen ergaben unter identischen Bedingungen einen 65mal langsameren Umsatz. Der Unterschied kann von den verschiedenen Enzympräparationen herühren; wahrscheinlich wird er aber durch das Vorliegen von Carbaminat im Gleichgewicht mit **1a** hervorgerufen. Carbaminat dürfte in den hier berichteten Versuchen nicht gebildet worden sein.

¹⁸⁾ G. Hartmann und Th. Leibach, unveröffentlichte Ergebnisse, Würzburg 1969.

¹⁹⁾ W. E. Razzell und H. G. Khorana, J. biol. Chemistry **234**, 2105 (1959).

²⁰⁾ Herstellerfirma: Calbiochem, Los Angeles.

Zur Erkennung der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside (**1**) auf den Dünnschichtplatten diene das Ninhydrin-Sprühereagenz 0.1% der Firma Merck. Zur Identifizierung der nitrogruppenhaltigen Substanzen besprühte man die Platten mit 4-Dimethylamino-benzaldehyd/Salzsäure²¹⁾.

Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b mg/l; Laufmittel: n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (7 : 1 : 2) (A) bzw. Äthanol/1 m Ammoniumacetat (7 : 3) (B).

Dünnschichtchromatographie: Für analytische Zwecke wurden Silicagel-Dünnschichtplatten F₂₅₄ (Merck AG), für präparative Trennungen Silicagel PF₂₅₄ (Merck AG) verwendet. Laufmittel: System A bzw. Aceton/Benzol/Wasser (8 : 2 : 1) (C) bzw. Chloroform/Methanol (85 : 15) (D).

Elektrophorese: Papier Whatman 3 MM. Laufmittel 0.1 m Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 7.4 (E).

Die in der Tabelle aufgeführten *R_F*-Werte waren hinreichend reproduzierbar.

Schmelzpunkte, Analysen und Spektraldaten der dargestellten Verbindungen s. Tab.

5'-Amino-5'-desoxy-adenosin (1b): 1 mMol 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin, *p*-Toluolsulfonat⁵⁾, wurde in 20 ccm bidestilliertem Wasser mit 10 g neutral gewaschenem, stark basischem Ionenaustauscher Merck III $\frac{1}{2}$ Stde. gerührt. Anschließend eluierte man in einer Säule mit etwa 5 l dest. Wasser. Das Lösungsmittel wurde dann unter Ausschluß von Kohlendioxid im Rotationsverdampfer bei Ölpumpenvak. bis auf 100 ccm eingengt und zu einer weißen, flockigen Substanz lyophilisiert. Ausb. 208 mg (80%).

5'-Amino-5'-desoxy-3'-O-acetyl-thymidin: 10 mMol 5'-Azido-5'-desoxy-thymidin⁴⁾ (**9**) wurden in 100 ccm absol. Pyridin und 14 ccm Acetanhydrid (140 mMol) etwa 15 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend wurde i. Vak. zur Trockne eingengt und in 100 ccm Wasser suspendiert. Man extrahierte mit 250 ccm Chloroform, engte zur Trockne ein und kristallisierte das Acetylierungsprodukt aus Äthanol/Petroläther (1 : 10) um. Ausb. 2.78 g (90%).

3 mMol Acetylierungsprodukt wurden in 100 ccm Äthanol mit 300 mg Platin(IV)-oxid in einer Schüttelente unter Normaldruck hydriert. Zur Entfernung des gebildeten Stickstoffs wurde des öfteren mit Wasserstoff gespült. Nach Abfiltrieren des Platins engte man im Rotationsverdampfer ein, wobei 765 mg (90%) farblose Nadeln auskristallisierten.

*N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- und N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-bis-[β , β , β -trichlor-äthylester]-amid (**4a1** bzw. **4b1**):* 1 mMol **1a**⁴⁾ bzw. **1b** wurde durch mehrfaches Abddestillieren von absol. Pyridin getrocknet, in einem Gemisch von 5 ccm absol. Pyridin/420 μ l Triäthylamin (3 mMol) aufgenommen bzw. suspendiert und unter Eiskühlung mit 1.3 mMol Phosphorsäure-bis-[β , β , β -trichlor-äthylester]-chlorid (**2**) versetzt. Nach 5 Stdn. bei Raumtemp. engte man i. Vak. zur Trockne ein, löste den Rückstand in 50 ccm Chloroform und extrahierte mit 3 mal 25 ccm dest. Wasser. Nach Einengen der Chloroformphase wurde das Rohprodukt aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. — **4a1**: Ausb. 262 mg (45%), **4b1**: Ausb. 395 mg (65%).

*Spaltung der Phosphorsäure-diesteramide **4a1** bzw. **4b1** zu den Phosphorsäure-monoesteramiden **6a1** bzw. **6b1**:* 0.01 mMol (100 bzw. 160 OD) **4a1** bzw. **4b1** wurden in 2 ccm Pyridin/konz. Ammoniak (1 : 1) 3 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Einengen i. Vak. wurden **6a1** bzw. **6b1** durch Elektrophorese im Puffersystem D isoliert. **6a1**: Ausb. 92 OD (90%), **6b1**: Ausb. 144 OD (90%).

*N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- und N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-bis-[*p*-nitrobenzylester]-amid (**4a2** bzw. **4b2**):* 1 mMol **1a** bzw. **1b** wurden, wie oben beschrieben, getrock-

²¹⁾ Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Nr. 72, S. 18, E. Merck AG, Darmstadt.

Schmelzpunkte, Analysen, Spektraldaten und R_F -Werte der dargestellten Verbindungen

Substanzen Summenformel (Mol.-Gew.)	Nr.	Schmp.	Analyse		UV (Methanol) λ_{max} (m μ)	NMR _a δ (ppm)	Massenspektrum m/e (rel. Int.)	Elektro- phorese (Eb.)	Papierchromato- graphie		Dünnschicht- chromato- graphie C ₆	
			C	H					A	B		
5'-Amino-5'-desoxy-thymidin C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄ (241.2)	1a	178 – 181°	Ber. 49.83 5.86 N 17.44 Gef. 49.93 5.94 N 17.27		265		242 (0.5%) M [⊕] +1 126 (50%) B + 1(d) 116 (100%) M [⊕] –B	0.39	0.45	0.61	0.1	0.9
5'-Azido-5'-desoxy-3'-O- acetyl-thymidin C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₃ (309.3)		113 – 114°	Ber. 46.59 4.89 N 22.65 Gef. 46.59 4.84 N 21.97		264	2.05 (s/3H)	309 (6%) M [⊕] 126 (32%) B + 1 124 (100%) B–1 43 (94%) Acetyl	–	0.75	0.85	1.1	–
5'-Amino-5'-desoxy-3'-O- acetyl-thymidin C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₅ (283.2)		139 – 142°			264	2.05 (s/3H)	283 (1%) M [⊕] 126 (76%) B + 1 43 (100%) Acetyl	0.33	0.57	0.70	0.8	1.03
N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- phosphorsäure-bis- β - β - trichlor-äthylester]-amid C ₁₄ H ₁₈ Cl ₆ N ₃ O ₇ P (584.0)	4a1	171 – 172°	Ber. 28.78 3.10 P 5.30 Gef. 28.86 3.09 P 5.36		265	4.64 (d/2H) ^e 4.67 (d/2H)	456 (1%) M [⊕] f – B 126 (100%) B + 1	–	0.88	0.9	1.17	–
N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- phosphorsäure- β - β -trichlor- äthylester]-amid C ₁₂ H ₁₇ Cl ₃ N ₃ O ₇ P (452.6)	6a1				265			0.52	0.69	0.75	–	–
N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- phosphorsäure-bis-(<i>p</i> -nitro- benzylester)-amid C ₂₄ H ₂₆ N ₅ O ₁₁ P (591.4)	4a2	160 – 162°	Ber. 48.77 4.43 N 11.85 Gef. 48.59 4.40 N 11.62		265	8.16 (d/4H) 7.60 (d/4H) 5.10 (d/4H)		–	0.85	0.85	1.05	–
N-[5'-Desoxy-3'-O-acetyl- thymidinyl-(5')]-phosphorsäure- [<i>p</i> -nitro-phenylester]-amid C ₁₈ H ₂₁ N ₄ O ₁₀ P (484.3)	6a3				269 300 (Schulter)	8.08 (d/2H) 7.35 (d/2H) 2.00 (s/3H)		0.48	0.65	0.72	0.53	–
N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- phosphorsäure-[<i>p</i> -nitro- phenylester]-amid C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O ₉ P (442.3)					269 300 (Schulter)			0.44	0.59	0.67	0.44	–
N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]- phosphorsäureamid C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₇ P (322.2)	7a				265			0.85	0.16	–	–	0.14
5'-Amino-5'-desoxy- adenosin C ₁₀ H ₁₄ N ₆ O ₃ · 2H ₂ O (302.2)	1b	146 – 149°	Ber. 39.73 6.01 N 27.82 Gef. 38.58 5.47 N 27.68		258		266 (0.5%) M [⊕] 136 (100%) B + 2	0.23	0.27	–	–	0.85

N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]- phosphorsäure-bis-[β,β,β- trichlor-äthylester]-amid C ₂₄ H ₁₇ Cl ₆ N ₆ O ₆ P (609.0)	4b1	200 -- 202 ^b	Ber. 27.61 2.81 Cl 34.92 Gef. 27.94 2.92 Cl 34.52	258	4.63 (d/2H) ^c 4.67 (d/2H)	606 (7%) M ^d 135 (100%) B + I	—	0.87	0.84	0.92
N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]- phosphorsäure-[β,β,β-trichlor- äthylester]-amid C ₁₂ H ₁₀ Cl ₃ N ₆ O ₆ P (477.6)	6b1			258			0.42	0.63	0.65	0.16
N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]- phosphorsäure-bis-[p-nitro- benzylester]-amid C ₂₄ H ₂₂ N ₈ O ₁₀ P (616.5)	4b2	178 ^b	Ber. 46.79 4.09 N 18.22 Gef. 46.58 4.06 N 18.0	259	8.16 (d/4H) 7.58 (d/4H) 5.10 (d/4H)		—	0.77	0.75	0.85
N-[5'-Desoxy-adenosyl-(5')]- phosphorsäureamid C ₁₀ H ₁₃ N ₆ O ₆ P (346.2)	7b			259			0.70	—	—	—
5-O-Trityl-thymidyl-(3'-5')- 5-amino-5'-desoxy-thymidin- [β,β,β-trichlor-äthylester] C ₄₁ H ₄₁ Cl ₃ N ₅ O ₁₂ P (935.2)	16			264	7.32 (m/18H) 4.48; 4.54 (d; d/1H + 1H) ^e		—	0.85	0.87	1.24
Thymidyl-(3'-5')-5'-amino- 5'-desoxy-thymidin-[β,β,β- trichlor-äthylester] C ₂₃ H ₂₉ Cl ₃ N ₅ O ₁₂ P (692.8)	15			264			—	0.66	0.80	0.70
Thymidyl-(3'-5')-5'- amino-5'-desoxy-thymidin C ₂₀ H ₂₈ N ₅ O ₁₁ P (561.4)	13			264			0.44	0.23	0.52	0.27
5-Azido-5'-desoxy-thymidyl-17 (3'-5')-5'-amino-5'-desoxy- thymidin-[β,β,β-trichlor-äthylester] C ₂₂ H ₂₈ Cl ₃ N ₈ O ₁₀ P (701.9)	17			263	4.60; 4.55 (d; d/1H + 1H) ^e		—	0.67	0.84	1.15
5'-Azido-5'-desoxy-thymidyl-14 (3'-5')-5'-amino-5'-desoxy- thymidin C ₂₀ H ₂₈ N ₈ O ₁₀ P (570.5)	14			263			0.43	0.34	0.63	0.37

a) An NMR-Daten wurden nur für neu eingeführte Gruppen beweisende Signale aufgeführt, s → Singulett; d → Dublett; m → Multipllett.

b) Ber.

c) Die

d) Die

e) Ein

f) Der

Die elektrophoretischen Beweglichkeiten wurden bezogen auf Thyminid-5'-phosphat als Standard.

Die dünnschichtchromatographischen R_F-Werte bezog man auf Thyminid.

Basen.

Der M^d-Peak wurde auf ³¹P-Cl bezogen, das Isotopenmuster entspricht dem für 6 Cl-Atome.

net und in 10 ccm absol. Dioxan¹¹⁾ sowie 0.4 ccm *Triäthylamin* (5 mMol) gelöst bzw. suspendiert. Man fügte dann unter Eiskühlung 410 mg (1.1 mMol) *Phosphorsäure-bis-[p-nitro-benzylester]-chlorid* (**3**)⁹⁾ portionsweise hinzu und rührte etwa 1 Stde. bei Raumtemp. Anschließend wurde eingeeignet, der Rückstand in wenig Acetonitril aufgenommen und durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel im System C **4a2** bzw. **4b2** isoliert. Umkristallisation erfolgte aus Äthanol/Petroläther. **4a2**: Ausb. 492 mg (83%), **4b2**: Ausb. 340 mg (55%).

Hydrierung von 4a2 bzw. 4b2 zu den Phosphorsäureamiden 7a bzw. 7b: 0.1 mMol **4a2** bzw. **4b2** wurden in 30 ccm Äthanol/Phosphatpuffer pH 11 (1 : 1) mit 2 Spatelspitzen *Palladium/Kohle* (Merck) 1½ Stdn. in der Schüttelzelle bei Normaldruck hydriert. Die Phosphorsäureamide **7a** bzw. **7b** wurden durch Dünnschichtchromatographie in System A sowie Elektrophorese in System E nachgewiesen.

7a bzw. **7b** wurden eluiert und rechromatographiert. Für **7a** sowohl als **7b** traten dann nur noch die Flecke der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside **1a** und **1b** sowie anorganisches Phosphat²²⁾ auf.

N-[5'-Desoxy-thymidinyl-(5')]-phosphorsäure-[p-nitro-phenylester]-amid (6a3): 1 mMol 5'-Amino-5'-desoxy-3'-O-acetyl-thymidin wurde, wie beschrieben, getrocknet, in 30 ccm *Pyridin* aufgenommen, bei -30 bis -40° während 8 Stdn. in eine Lösung von 900 mg (3.5 mMol) *Phosphorsäure-[p-nitro-phenylester]-dichlorid* (**5**)¹⁴⁾ in 2 ccm absol. *Pyridin* getropft und anschließend 2 weitere Stdn. bei -30° stehengelassen. Dann gab man 5 ccm Wasser dazu, destillierte das Lösungsmittel unter Lichtausschluß i. Vak. ab, nahm den Rückstand in 5 ccm Methanol auf und isolierte das *N-[5'-Desoxy-3'-O-acetyl-thymidinyl-(5')]-phosphorsäure-[p-nitro-phenylester]-amid* durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System C. Die Chromatographie wurde wegen der Instabilität der Verbindung im Kühlraum (4°) durchgeführt, die Lösungen bei 3-5° unter Lichtausschluß eingeeignet oder lyophilisiert. Ausb. 314 mg (65%).

Zur Abspaltung der Acetylgruppe wurden 0.05 mMol (750 OD) 3'-O-Acetyl-Derivat in 2 ccm konz. *Ammoniak* 3 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt und dann nach Zugabe von 2 ccm Wasser unter Lichtausschluß lyophilisiert. Ausb. an **6a3** quantitativ.

Zur Abspaltung der *p*-Nitrophenylgruppe wurden 80 OD (5 µMol) **6a3** in 100 µl 1 *n* *NaOH* gelöst und im Einschlußrohr 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Die Spaltung verlief quantitativ. Der Nachweis der Spaltprodukte *p*-Nitrophenolat-Anion und Phosphorsäureamid **7a** erfolgte durch Elektrophorese in Puffer-System E.

5'-O-Trityl- bzw. 5'-Azido-5'-desoxy-thymidylyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidin-[[β,β,β-trichlor-äthylester] (16 bzw. 17): 1 mMol 5'-O-Trityl-thymidin (**8**)¹⁴⁾ bzw. 5'-Azido-5'-desoxy-thymidin (**9**)³⁾ wurden, wie beschrieben, getrocknet, in 20 ccm absol. *Pyridin* aufgenommen, während 8 Stdn. in eine Lösung von 160 µl (1 mMol) *Phosphorsäure-[[β,β,β-trichlor-äthylester]-dichlorid* (**10**)¹⁵⁾ in 2 ccm absol. *Pyridin* bei Raumtemp. getropft und anschließend über Nacht stehengelassen. Die so erhaltenen 5'-O-Trityl- bzw. 5'-Azido-5'-desoxy-thymidin-3'-phosphorsäure-[[β,β,β-trichlor-äthylester]-chloride (**11** bzw. **12**) wurden nicht isoliert, sondern man tropfte das Reaktionsgemisch bei 0° während 4 Stdn. direkt in eine Lösung von 1 mMol 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin (**1a**) in 5 ccm absol. *Pyridin*. Anschließend versetzte man mit 5 ccm Wasser, destillierte das Lösungsmittel i. Vak. ab, nahm in 5 ccm Methanol auf und isolierte **16** bzw. **17** durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System D, Elution erfolgte mit Methanol. **16**: Ausb. 280 mg (30%), **17**: Ausb. 245 mg (35%).

²²⁾ H. Hettler in M. Lederer, *Chromatographie Reviews*, Bd. 1, S. 225, Elseviers Publ. Comp., Amsterdam 1959.

Abspaltung der Tritylgruppe aus 16 zu 15: 0.01 mMol (100 OD) **16** wurden in 5 ccm 50proz. Essigsäure 15 Min. auf 100° erwärmt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels sowie Aufnehmen des Rückstandes in wenig Methanol isolierte man **15** durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System C. Ausb. 90 OD (90%).

Abspaltung der Trichloräthyl-Gruppe aus 15 bzw. 17 zu den Dinucleosidphosphat-Analogen 13 bzw. 14: 0.01 mMol (200 OD) **15** bzw. **17** wurden in 10 ccm Dioxan/1 ccm 1*n* NaOH 4 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels nahm man in wenig Methanol auf und isolierte **13** bzw. **14** durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel in System A. **13:** Ausb. 182 OD (90%), **14:** Ausb. 175 OD (88%).

Enzymatische Hydrolyse der Phosphorsäuremonoester-amide 6 sowie des Thymidylyl-(3'-5')-5'-amino-5'-desoxy-thymidins (13) durch Schlangengift-Phosphodiesterase: 1 μ Mol **6** bzw. **13** wurde in 0.1 ccm 0.1 *m* Tris-Puffer, pH 8.6, mit 10 μ g Enzym (E. C. 3.1.4.1.; Firma Boehringer, Mannheim) 5 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Hydrolysat wurde papier- und dünn-schichtchromatographisch in System A getrennt.

Enzymatische Spaltung des Dinucleosidphosphat-Analogen 13 durch Phosphodiesterase aus Kalbsmilz: 10 μ Mol **13** wurden in 0.2 ccm 0.5 *m* Ammoniumsuccinat-Puffer, pH 5.9, mit 20 μ g Enzym (E. C. 3.1.4.1.; Firma Boehringer, Mannheim) bei 37° inkubiert. Man entnahm während der Reaktion 12mal je 0.01 ccm, trennte dünn-schichtchromatographisch in System A, eluierte jeweils die Zone des 5'-Amino-5'-desoxy-thymidins (**1a**) mit Wasser/Methanol (1 : 1), bestimmte dessen optische Dichte und erhielt so ein Zeit-Umsatz-Diagramm der enzymatischen Hydrolyse.

In einem Parallelansatz wurde die Hydrolyse der Vergleichssubstanz Thymidylyl-(3'-5')-thymidin unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Man isolierte hier nach Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in System C das durch die Reaktion freigesetzte *Thymidin*.

Hydrolyse der 6-Aminogruppe des 5'-Amino-5'-desoxy-adenosins (1b) durch die Adenosin-Desaminase zum 5'-Amino-5'-desoxy-inosin: $3 \cdot 10^{-7}$ Mol (4.8 OD) **1b** wurden in 3 ccm 0.05 *m* Phosphat-Puffer, pH 7.4, mit 0.1 μ g Enzym (E. C. 3.5.4.4., Firma Boehringer) bei 25° inkubiert und die Abnahme der Extinktion bei 265 $m\mu$ im Cary verfolgt. Unter gleichen Bedingungen wurde die Hydrolyse des Adenosins gemessen.