

Wolfgang Freist, Kay Schattka, Friedrich Cramer und Bernd Jastorff

## Neue Darstellungsmethode von Nucleotid-Analogen der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside<sup>1)</sup>

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 29. Oktober 1971)

Eine neue, mit hohen Ausbeuten verlaufende Darstellung von Diestern der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosid-*N*-phosphate **4** bzw. **6** durch Phosphorylierung verschiedener 5'-Azido-5'-desoxy-nucleoside **3** bzw. **5** mit Triphenyl- bzw. Trimethylphosphit (**1** bzw. **2**) wird beschrieben. Durch Abspaltung der *O*-Schutzgruppen und einer Phenylgruppe aus den Diphenylesteramiden **4a** und **6a** erhält man Substrate für die Schlangengift-Phosphodiesterase.

### A new Synthesis of Nucleotide Analogues of the 5'-Amino-5'-deoxynucleosides<sup>1)</sup>

A new procedure for the synthesis of diesters of 5'-amino-5'-deoxynucleoside-phosphoramidates **4** and **6** in high yields via phosphorylation of various 5'-azido-5'-deoxynucleosides **3** and **5** with triphenyl- or trimethylphosphite (**1** and **2**) is described. Removal of the *O*-protecting groups and one phenyl group from the diphenyl ester phosphoramidates **4a** and **6a** yields substrates for snake venom phosphodiesterase.

5'-Amino-5'-desoxy-nucleosid-*N*-phosphate sind Nucleotidanaloge, in denen der 5'-Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt ist. Um das Verhalten dieser Verbindungen in biologischen Systemen zu studieren, wurden bereits einige Vertreter synthetisiert<sup>1-4)</sup>. Als besonders interessant haben sich im biologischen Test die P–N-Analogen des 3'-5'-c-AMP<sup>1)</sup> herausgestellt<sup>5)</sup>.

Alle bisherigen Synthesen zur Knüpfung der P–N-Bindung verliefen über die Phosphorylierung der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside — dargestellt durch Hydrogenolyse von 5'-Azido-5'-desoxy-nucleosiden<sup>6-8)</sup> bzw. die Aminolyse von 5'-Tosyl-nucleosiden<sup>1,2,9)</sup> — mit Phosphorsäurediesterhalogeniden. Wir berichten hier über eine neue vereinfachte Darstellung dieser Bindung durch direkte Phosphorylierung von 5'-Azido-5'-desoxy-nucleosiden mit Trialkyl- bzw. Triarylphosphiten. Die Um-

<sup>1)</sup> Nucleotidanaloge mit P–N-Bindung, V. Mittel.; IV. Mittel.: A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer und H. Hettler, *J. org. Chemistry* **36**, 3029 (1971).

<sup>2)</sup> B. Jastorff und H. Hettler, *Chem. Ber.* **102**, 4119 (1969).

<sup>3)</sup> B. Jastorff und H. Hettler, *Tetrahedron Letters* [London] **30**, 2543 (1969).

<sup>4)</sup> R. L. Letsinger und W. S. Mungall, *J. org. Chemistry* **35**, 3800 (1970).

<sup>5)</sup> T. M. Konijn, Huprecht Laboratory, Univ. Utrecht, persönl. Mittel. 1971.

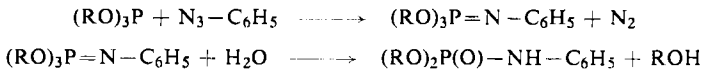
<sup>6)</sup> J. P. Horwitz, A. J. Tomson, J. A. Urbanski und J. Chua, *J. org. Chemistry* **27**, 3045 (1962).

<sup>7)</sup> W. Jahn, *Chem. Ber.* **98**, 1705 (1965).

<sup>8)</sup> M. G. Stout, M. J. Robins, R. K. Olsen und R. K. Robins, *J. med. Chem.* **12**, 658 (1969).

<sup>9)</sup> R. R. Schmidt, U. Schleuz und D. Schwille, *Chem. Ber.* **101**, 590 (1968).

setzung von Phenylazid mit Triestern der phosphorigen Säure zu Phosphorsäurederivaten haben *Kabachnik* und *Gilyarov* untersucht<sup>10</sup>. Dabei wurden Derivate der Imidophosphorsäure isoliert, die mit Wasser in Amidophosphorsäureester übergingen.



Wir haben mit dieser Reaktion 5'-Azido-5'-desoxy-nucleoside sowohl aus der Desoxyribo- als auch aus der Ribo-Reihe mit Trimethyl- bzw. Triphenylphosphit zu den entsprechenden 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosid-*N*-phosphaten umgesetzt.

Dabei wählten wir als Modellnucleoside in der Desoxyribo-Reihe das Thymidin, in der Ribo-Reihe Adenosin, da von beiden bereits Mono- und Diester der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosid-*N*-phosphate als Vergleichsmaterial zur Verfügung standen. Zusätzlich bezogen wir in der Ribo-Reihe das Guanosin in unsere Untersuchungen ein, da die Synthese der 5'-Amino-5'-desoxy-guanosin-*N*-phosphate auf klassischem Weg schwierig ist und mit niedrigen Ausbeuten<sup>11</sup> verläuft.

An *O*-geschützten Azidonucleosiden, die als Ausgangsmaterialien für die Phosphorylierung eingesetzt wurden, wählten wir 5'-Azido-5'-desoxy-3'-*O*-acetyl-thymidin (**3**)<sup>2</sup>, 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-*O*-isopropyliden-guanosin (**5a**)<sup>9</sup> sowie 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-*O*-[2.4-dimethoxy-benzyliden]-adenosin (**5c**). Die bisher nicht beschriebene Verbindung **5c** setzten wir ein, da sich die Dimethoxybenzylidengruppe im Gegensatz zur Isopropylidengruppe unter so milden sauren Bedingungen abspalten läßt, daß die P–N-Bindung nicht angegriffen wird. Die Synthese von **5c** folgt, ausgehend von 2'.3'-*O*-[2.4-Dimethoxy-benzyliden]-adenosin<sup>12</sup>, in etwas modifizierter Weise der von *Jahn*<sup>7</sup> für die entsprechende Isopropylidenverbindung angegebenen.

Die Reaktion der geschützten Azidonucleoside **3**, **5a**–**5c** mit den Phosphiten **1** und **2** wurde in Dimethylformamid oder Dioxan vorgenommen. Die Reaktivität der Azide erwies sich dabei als sehr unterschiedlich. Während sich z. B. das Guanosinderivat **5a** schon bei Raumtemperatur mit Trimethylphosphit (**2**) umsetzen ließ, lief die Reaktion mit den Verbindungen **3** und **5c** erst nach Erwärmen auf 80–100° ab.

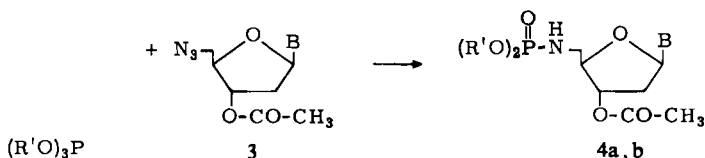
Als Reaktionsprodukt erhielten wir in allen Fällen mit ca. 90% Ausbeute gleich die Diester der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosid-*N*-phosphate **4** bzw. **6**. Derivate der Imidophosphorsäure waren nicht nachweisbar.

Die Umsetzung von nicht *O*-geschützten Azidonucleosiden lieferte eine Vielzahl schwer trennbarer Produkte, lediglich im Falle des ungeschützten 5'-Azido-5'-desoxy-guanosins (**5b**) verlief die Reaktion mit Trimethylphosphit (**2**) mit sehr guten Ausbeuten zum Diester des 5'-Amino-5'-desoxy-guanosin-*N*-phosphates (**6c**).

<sup>10</sup> *M. I. Kabachnik* und *V. A. Gilyarov*, *Izvest. Akad. Nauk SSSR, Otdel. Khim. Nauk* **1956**, 790 (russisch), *C. A.* **51**, 1823<sup>b</sup> (1957); *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science, New York, N. Y.* **1956** (7), 809 (englisch).

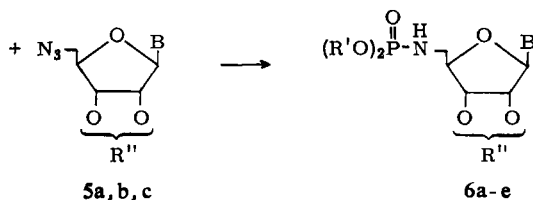
<sup>11</sup> *K. Schattka*, Göttingen, unveröffentlichte Ergebnisse.

<sup>12</sup> *F. Cramer, W. Saenger, K. H. Scheit* und *J. Tennigkeit*, *Liebigs Ann. Chem.* **679**, 159 (1964).



1: R' = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

2: R' = CH<sub>3</sub>



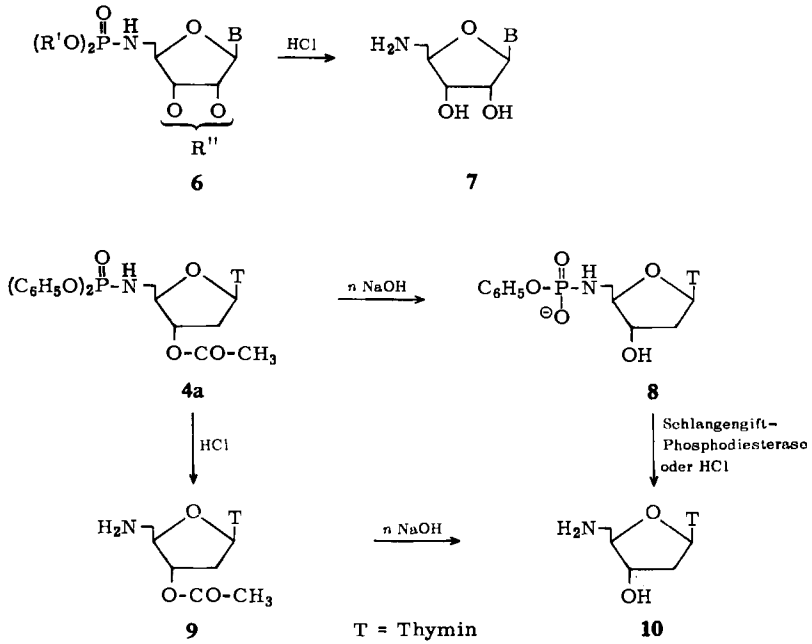
	3	4a	4b	5a	5b	5c
B	Thymin	Thymin	Thymin	Guanin	Guanin	Adenin
R'	-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	-	-	-
R''	-	-	-	Isopropyliden	H, H	2,4-Dimethoxybenzyliden

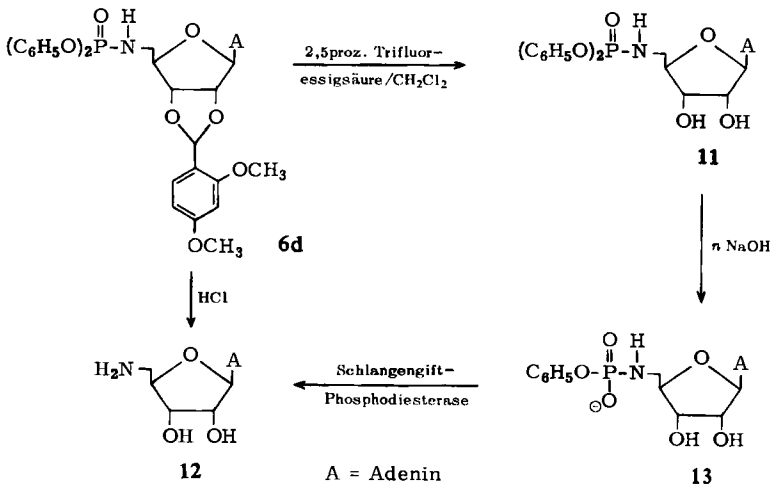
	6a	6b	6c	6d	6e
B	Guanin	Guanin	Guanin	Adenin	Adenin
R'	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>
R''	Isopropyliden	Isopropyliden	H, H	2,4-Dimethoxybenzyliden	2,4 Dimethoxybenzyliden

Durch Charakterisierung je eines Diphenyl- bzw. Dimethylesteramids (**4a** bzw. **6b**) mit Hilfe der UV-, IR-, NMR- und Massen-Spektroskopie sowie einer Elementaranalyse wurde die angegebene Reaktionsfolge bewiesen. Die Darstellung der übrigen beschriebenen Verbindungen **4** und **6** erfolgte im Mikromaßstab (0.1 mMol). Hier wurden die Substanzen durch UV- und IR-Spektroskopie, chromatographischen Vergleich mit ähnlichen Diesteramiden<sup>2)</sup> sowie den im folgenden beschriebenen chemischen bzw. enzymatischen Abbau charakterisiert.

Durch Behandlung mit *n* HCl entstehen in der Ribo-Reihe unter Abspaltung der säurelabilen O-Schutzgruppen und Spaltung der säurelabilen P-N-Bindung<sup>2)</sup> direkt die entsprechenden 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside **7**, die mit authentischem Material identisch sind; ebenso erhält man in der Desoxyreihe nach vor- oder nachheriger alkalischer Abspaltung der O-Acetylgruppe das 5'-Amino-5'-desoxy-thymidin (**10**).



Als Substrate für die Schlangengift-Phosphodiesterase benötigt man Monoesteramide mit freien OH-Gruppen. Die selektive Abspaltung der O-Schutzgruppen ohne gleichzeitige Spaltung der P-N-Bindung gelingt bei den Derivaten der Ribo-Reihe nur bei der 2,4-Dimethoxybenzylidengruppe, die sich mit Trifluoressigsäure in Methylenechlorid entfernen läßt.



Die Monoesteramide **8** und **13** erhält man im Fall der Diphenylesteramide **4a** und **11** durch Behandlung mit *n* NaOH in Methanol. Im Falle des Thymidinderivates **4a** erhielt man dabei das gewünschte Substrat in einem Reaktionsschritt.

Die Monoester **8** und **13** wurden enzymatisch durch Schlangengift-Phosphodiesterase gespalten, wobei man die 5'-Amino-nucleoside **10** und **12** erhält, da die bei der enzymatischen Spaltung gebildeten freien Aminonucleosid-*N*-phosphate zerfallen<sup>2)</sup>.

Im Falle der Methyl-Derivate **4b**, **6b** und **6c** gelingt die alkalische Hydrolyse nicht. Auch nach dem Verfahren von *Zervas* und *Dilaris*<sup>13)</sup> ist keine Entmethylierung mit Natriumjodid zu erreichen.

Die guten Ausbeuten und relativ milden Reaktionsbedingungen lassen die Phosphorylierung von Azidonucleosiden als ein vorteilhaftes Verfahren zur Darstellung von Aminonucleosid-*N*-phosphaten erscheinen.

Wir danken Frau *T. Krebs*, Frau *E. Kassner*, Herrn *F. Tlatlik* und Herrn *J. Böttger*, die mit großem Eifer und Geschick zu der Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. *H. M. Schiebel* sind wir für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren zu großem 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 NMR-Spektren wurden mit dem Varian Modell HA-100 bzw. 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 dünn-schichtchromatographisch mit dem Vitatron-Dünn-schicht-Densitometer TLD 100 bestimmt.

Zur Erkennung der 5'-Amino-5'-desoxy-nucleoside (**7**) auf Dünn-schichtplatten bzw. Papier diente Ninhydrin. Der Nachweis freier vicinaler Hydroxylgruppen wurde mit Benzidin-Natriummetaperjodat-Reagenz geführt<sup>14)</sup>. Phosphor wies man mit dem Isherwood-Haynes-Reagenz<sup>15)</sup> nach. Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b mgI; Laufmittel: *n*-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2) (A). Dünn-schichtchromatographie: Für analytische Zwecke wurden Kieselgel-DC-Fertigplatten G 1500 LS 254 von Schleicher & Schüll, für präparative Trennungen Silicagel-PF 254-Platten (Merck AG) verwendet. Laufmittel-Systeme: A bzw. Aceton/Benzol/Wasser (8:2:1) (B) bzw. Chloroform/Methanol (95:5) (C) bzw. (9:1) (D). Zur Bestimmung der *R<sub>F</sub>*-Werte wurde bei jeder Base das geschützte Ausgangsazid als Bezugssubstanz gleich 1 gesetzt. Elektrophorese: Papier Whatman 3 MM bzw. Schleicher & Schüll 2043. Laufmittel 0.1 *m* Triäthylammonium-hydrogencarbonat-Puffer pH 7.4 (E). An NMR-Daten wurden nur für neueingeführte Gruppen beweisende Signale aufgeführt; TMS als innerer Standard.

<sup>13)</sup> *L. Zervas* und *J. Dilaris*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5354 (1955); *J. Dilaris*, *Chem. Ber.* **91**, 833 (1958).

<sup>14)</sup> Anfärbereagentien für Dünn-schicht- und Papierchromatographie Nr. **218**, S. 70, E. Merck AG, Darmstadt 1970.

<sup>15)</sup> *H. Hettler* in *M. Lederer*, *Chromatographic Reviews*, Bd. 1, S. 225, Elseviers Publ. Comp., Amsterdam 1959.

5'-Azido-5'-desoxy-2',3'-O-[2,4-dimethoxy-benzyliden]-adenosin (**5c**): Zu 10 g (25 mMol) 2',3'-O-[2,4-Dimethoxy-benzyliden]-adenosin<sup>12)</sup> in 100 ccm absol. Pyridin tropfte man innerhalb von 2 Stdn. unter Rühren bei  $-10$  bis  $-15^\circ$  eine Lösung von 5.7 g (30 mMol) *p*-Toluolsulfchlorid in 50 ccm Pyridin. Nach 24stdg. Schütteln bei  $4^\circ$  im Kühlraum wurde die Reaktionsmischung in 250 ccm 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben, die mit 100 ccm Chloroform unterschichtet war, und die wäbr. Lösung nach Abtrennen der Chloroformphase noch zweimal mit je 100 ccm Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden zweimal mit je 30 ccm 1proz. Ammoniak-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Die zunächst ölige, nicht gereinigte 5'-Tosylverbindung wurde nach mehrmaligem Abdampfen mit Aceton fest. Ausb. 80% (spektralphotometrisch bestimmt). Rohausb. 14.1 g.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max_1} = 260$ ,  $\lambda_{\max_2} = 232$  nm.

IR: 1176/cm (Tosylesterbande).

Das Rohprodukt wurde mit 50 ccm Ameisensäureessigsäureanhydrid<sup>17)</sup> versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Das überschüss. Anhydrid wurde an der Ölpumpe abgedampft und die 6-Formylverbindung in fester Form erhalten. Rohausb. 14.8 g. Ausb. quantitativ (spektralphotometrisch bestimmt).

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max_1} = 272$ , 280 nm (Schulter).

IR: 1176 (Tosylesterbande), 1710/cm (Formylbande).

Anschließend versetzte man die Lösung des Rohproduktes in 100 ccm absol. DMF innerhalb von 15 Min. bei  $100^\circ$  mit 3.2 g Natriumazid (60 mMol), kühlte sehr schnell auf  $0^\circ$ , dampfte das Dimethylformamid vollständig ab, nahm den Rückstand in 75 ccm Wasser auf, das mit 75 ccm Chloroform unterschichtet war, und extrahierte die Wasserphase dann erschöpfend mit jeweils 50 ccm Chloroform.

Nach Eindampfen des Chloroforms wurde der Rückstand in 100 ccm Dioxan/konz. Ammoniak (1:1) gelöst und die Formylgruppe innerhalb von 3 Stdn. bei Raumtemperatur wieder abgespalten.

Nach erneutem Eindampfen wurde das Rohprodukt (11.7 g) in Essigester aufgenommen, durch Abdestillieren auf 15 g Aluminiumoxid (neutral) aufgezogen, und das Gemisch durch Abdampfen mit Benzol und Petroläther ( $60-80^\circ$ ) getrocknet. Das zurückbleibende homogene Pulver wurde auf einer mit 200 g Aluminiumoxid (Woelm, neutral, Akt.-St. 2) gefüllten Säule mit einem linearen Gradienten Benzol $\rightarrow$ Benzol/Methanol (9:1) (je 1.5 l) chromatographiert. Trotz der Absorption des Laufmittels konnte die Trennung mit Hilfe des Uvicord verfolgt werden. Ausb. 7.9 g (72% über alle Stufen) **5c**.

Das Produkt war für die folgenden Reaktionen genügend rein. Zur Analyse wurde eine Probe auf einer Kieselgel-Säule zunächst mit Chloroform gewaschen, dann mit einem Gradienten Chloroform $\rightarrow$ Chloroform/Methanol (95:5) nochmals chromatographiert und beim Abdampfen des Eluates als gelbliches amorphes Pulver erhalten. Alle Versuche, **5c** kristallin zu erhalten, mißlangen.

$C_{19}H_{20}N_8O_5$  (440.4) Ber. C 51.80 H 4.58 N 25.44 Gef. C 51.19 H 4.64 N 25.12

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max_1} = 259$ ,  $\lambda_{\max_2} = 232$  nm.

IR: 2105/cm (Azidbande).

NMR<sup>16)</sup> ( $\delta$ , ppm): 7.51–7.35 (m/1H); 6.65 (s/1H); 6.46–6.33 (m/2H); 3.60 (s/6H).

<sup>16)</sup> Erläuternde Angaben siehe allgemeine Bemerkungen.

<sup>17)</sup> K. Freudenberg und W. Jacob, Chem. Ber. **80**, 326 (1947).

*N*-[3'-*O*-Acetyl-5'-desoxy-thymidinyl-(5')] -phosphorsäure-diphenylester-amid (**4a**): 310 mg (1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-3'-*O*-acetyl-thymidin<sup>2</sup> (**3**) wurden in 10 ccm Dioxan (Fluka, gereinigt nach Hess und Frahm) mit 1.54 g (5 mMol) Triphenylphosphit (**1**) 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend dampfte man zur Trockne ein und isolierte **4a** durch präparative Schichtchromatographie im Laufmittel C. Für die Elementaranalyse kristallisierte man eine kleine Probe aus Äthanol durch Zugabe von Petroläther (Siedebereich 50–70°) um. Ausb. 448 mg (87%). Schmp. 152–153°.  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 1.08 (A); Dünnschichtchromatographie 0.92 (D).

$C_{24}H_{26}N_3O_8P$  (515.5) Ber. C 55.91 H 5.09 N 8.15 Gef. C 55.22 H 5.06 N 8.06

NMR<sup>16)</sup> ( $\delta$ , ppm): 7.32–7.14 (m/10 H); 2.00 (s/3 H).

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{max}$  = 265 nm.

IR: 1600 (Phenylbande); 1754/cm (Acetyl); keine Azidbande.

Massenspektrum: 515 (1%)  $M^+$ , 390 (8%)  $M^+$ –Base, 262 (100%)  $M^+$ – $C_{11}H_{13}N_2O_5$ , 126 (10%) Base + 1, 43 (15%) Acetyl.

*N*-[3'-*O*-Acetyl-5'-desoxy-thymidinyl-(5')] -phosphorsäure-dimethylester-amid (**4b**): 31 mg (0.1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-3'-*O*-acetyl-thymidin<sup>2</sup> (**3**) wurden in 5 ccm Dioxan (Fluka, gereinigt nach Hess und Frahm) mit 62 mg (0.5 mMol) Trimethylphosphit (**2**) 45 Min. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend dampfte man zur Trockne ein und trennte das Reaktionsgemisch durch präparative Schichtchromatographie im Laufmittel C auf. Ausb. 95% (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.97 (A); Dünnschichtchromatographie: 0.60 (D). Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv. HCl-Spaltung: Man erhält ein Ninhydrin-aktives Produkt.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{max}$  = 265 nm.

IR: keine Azidbande.

*N*-[5'-Desoxy-2'.3'-*O*-isopropyliden-guanosyl-(5')] -phosphorsäure-dimethylester-amid (**6b**): Eine Lösung von 87 mg (0.25 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-*O*-isopropyliden-guanosin (**5a**)<sup>8)</sup> in 2.5 ccm Dimethylformamid wurde bei 50° mit 620 mg (5 mMol) Trimethylphosphit (**2**) versetzt. Unmittelbar danach begann eine Gasentwicklung, die nach einer halben Stde. beendet war. Es wurde weitere 15 Min. gerührt und anschließend zur Trockne eingedampft. Der ölige Rückstand wurde zweimal mit Methanol zur Trockne eingedampft. Anschließend fällte man **6b** einmal aus Methanol durch Zugabe von Äther aus. Ausb. 98 mg (90%). Schmp. 235°.  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.96 (A); Dünnschichtchromatographie 0.88 (B); 1.1 (D).

$C_{15}H_{23}N_6O_7P$  (430.4) Ber. C 41.86 H 5.39 N 19.53 P 7.20

Gef. C 41.70 H 5.44 N 19.59 P 7.34

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{max}$  = 255; 275 nm (Schulter).

IR: keine Azidbande.

NMR<sup>16)</sup> ( $\delta$ , ppm): 3.58 (3/d;  $J$  = 11 Hz, P–O–C–H); 3.61 (3/d;  $J$  = 11 Hz, P–O–C–H).

Massenspektrum: 429 (1%),  $M^+$ –1; 193 (100%); 179 (96%); 165 (66%); 109 (50%).

*N*-[5'-Desoxy-2'.3'-*O*-isopropyliden-guanosyl-(5')] -phosphorsäure-diphenylester-amid (**6a**): Zur Lösung von 35 mg (0.1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-*O*-isopropyliden-guanosin<sup>8)</sup> (**5a**) in 2 ccm Dimethylformamid tropfte man bei 90° unter Rühren 260  $\mu$ l (1 mMol) Triphenylphosphit (**1**). Nach kurzer Zeit beobachtete man eine träge Gasentwicklung. 4 Stdn. später dampfte man bei Ölpumpenvak. das Lösungsmittel ab und isolierte **6a** als farbloses Pulver durch Ätherfällung aus dem Triphenylphosphit. Durch mehrfaches Waschen mit Äther

erhielt man eine chromatographisch einheitliche Substanz (55 mg). Ausb. quantitativ (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.70 (A); Dünnschichtchromatographie 1.1 (B); 1.3 (D). Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv. HCl-Spaltung: Liefert ein Ninhydrin-aktives Spaltprodukt. Schmp. 274°.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max}$  = 256, 274 nm (Schulter).

IR: 1600/cm (Phenylbande), keine Azidbande.

*N*-[5'-Desoxy-guanosyl-(5')]-phosphorsäure-dimethylester-amid (6c): Zur 60° warmen Lösung von 31 mg (0.1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-guanosin<sup>18)</sup> (5b) in 2 ccm Dimethylformamid tropftein 200  $\mu$ l Trimethylphosphit (2) (2 mMol). Nach beendeter Gasentwicklung wurden Lösungsmittel und überschüss. Trimethylphosphit abgedampft. Den Rückstand digerierte man mit Methanol und dampfte die Mischung erneut ein. Das farblose Produkt (6c) wurde mehrere Male mit Äther gewaschen und abzentrifugiert (35 mg). Ausb. 90–95% (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.71 (A); Dünnschichtchromatographie 0.53 (B); 0.23 (D). Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv. Nachweis auf vicinale, freie OH-Gruppen<sup>16)</sup> positiv. Spaltung mit HCl: Man erhält ein Ninhydrin-aktives Produkt.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max}$  = 256, 261 nm (Schulter).

IR: Keine Azidbande.

*N*-[5'-Desoxy-2'.3'-O-(2.4-dimethoxy-benzyliden)-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-diphenylester-amid (6d): 44 mg (0.1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-O-[2.4-dimethoxy-benzyliden]-adenosin (5c) wurden in 5 ccm Dioxan (nach Frahm und Hess) mit 154 mg (0.5 mMol) Triphenylphosphit (1) 6 Stdn. auf 80° erwärmt. Anschließend dampfte man das Dioxan i. Vak. ab und behandelte den öligen Rückstand so lange mit Äther, bis alles Triphenylphosphit ausgewaschen war. Zurück blieb die ölige, chromatographisch einheitliche Verbindung 6d (63 mg). Ausb. 95% (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 1.04 (A); Dünnschichtchromatographie 0.65 (D). Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv. HCl-Spaltung: Ninhydrin-aktives Spaltprodukt.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max_1}$  = 259;  $\lambda_{\max_2}$  = 232 nm.

IR: 1600/cm (Phenylbande); keine Azidbande.

*N*-[5'-Desoxy-2'.3'-O-(2.4-dimethoxy-benzyliden)-adenosyl-(5')]-phosphorsäure-dimethylester-amid (6e): 44 mg (0.1 mMol) 5'-Azido-5'-desoxy-2'.3'-O-[2.4-dimethoxy-benzyliden]-adenosin (5c) wurden in 5 ccm Dioxan (nach Hess und Frahm) mit 62 mg (0.5 mMol) Trimethylphosphit (2) 45 Min. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend destillierte man bei Ölpumpenvak. das Lösungsmittel und überschüss. Trimethylphosphit ab, dampfte noch einmal mit 2 ccm Wasser ein und isolierte aus dem Rückstand durch präparative Schichtchromatographie im Laufmittel D die ölige Verbindung 6e (50 mg). Ausb. 95% (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.97 (A); Dünnschichtchromatographie 0.52 (D). Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv. HCl-Spaltung: Ninhydrin-aktives Spaltprodukt.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max_1}$  = 259,  $\lambda_{\max_2}$  = 232 nm.

IR: Keine Azidbande bei 2105/cm.

*Abspaltung der 2.4-Dimethoxybenzyliden-Gruppe aus 6d*: 50 OD 6d wurden in 1 ccm 2.5proz. Trifluoressigsäure/Methylenchlorid 4 Stdn. bei -15° gehalten. Nach Abdampfen des Lösungsmittels isolierte man das ungeschützte Diesteramid 11 mittels Schichtchromatographie im

<sup>18)</sup> Die Isopropylidengruppe läßt sich aus 5a mit 50proz. Ameisensäure in 1 Stde. bei 80° abspalten.



Laufmittel-System B. Ausb. 85% (spektralphotometrisch bestimmt).  $R_F$ -Werte<sup>16)</sup>: Papierchromatographie 0.96 (A); Dünnschichtchromatographie 0.32 (D). Nachweis auf vicinale, freie OH-Gruppen<sup>16)</sup> positiv. Nachweis auf Phosphor<sup>16)</sup> positiv.

UV<sup>16)</sup>:  $\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$ .

*Säurespaltung mit HCl*: Jeweils 10 OD der Verbindungen **4a, b** bzw. **6a–e** wurden mit 100  $\mu\text{l}$  *n* HCl/Methanol (1:1) über Nacht bei 45° gehalten. Anschließend trennte man das Reaktionsgemisch papierchromatographisch auf und wies die gebildeten 5'-Amino-5'-desoxynucleoside **7** bzw. **9** durch Vergleich mit authent. Proben<sup>2)</sup> und Besprühen mit Ninhydrin nach.

*Abspaltung einer Phenylgruppe aus den Verbindungen 4a, 6a und 11*: 200 OD (0.02 mMol) **4a** wurden in 0.5 ccm *n* NaOH/Methanol (1:1) 2 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Das Reaktionsgemisch trennte man durch Papierelektrophorese im Puffersystem E auf und isolierte die Zone mit einer negativen Ladung durch Elution mit Methanol/Wasser (1:1) aus dem Papier. Entsprechend wurden 0.02 mMol der Diesteramide **6a** und **11** in die Monoesteramide übergeführt. Ausb. in allen Fällen etwa 40% (spektralphotometrisch bestimmt). Die UV-Spektren entsprechen denen der eingesetzten Nucleotide.

*Enzymatische Hydrolyse der Phosphorsäuremonoesteramide 8 und 13 durch Schlangengift-Phosphodiesterase*: 1  $\mu\text{Mol}$  **8** bzw. **13** wurde in 0.1 ccm 0.1 *m* Tris-HCl-Puffer, pH 8.6, mit 10  $\mu\text{g}$  Enzym (E.C. 3.1.4.1.; Firma Boehringer, Mannheim) 5 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Hydrolysat wurde papier- und dünnschichtchromatographisch in System A getrennt.

[425/71]