

Zur Reaktion von Aminonucleosiden mit Thiophosphorylierungsreagenzien

Michael Morr* und Ludger Ernst

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim

Eingegangen am 10. Oktober 1977

Die Reaktion von 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (1) und einiger Derivate mit Thiophosphorylchlorid bzw. mit Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester) sowie die Synthese der 3'-Amidoanalogen 5 und 9 und des 3',5'-Diamidoanalogen 27 von Adenosin-2',3'- bzw. -3',5'-cyclothionophosphat werden beschrieben. 5, 9 und 27 fallen als Diastereomergemische an, die chromatographisch getrennt werden. Die Umsetzung der cAMP-Analogen sowie die von 3 und 23 mit Diazomethan wird untersucht. Die Konstitution der neuen Verbindungen wird vor allem aus ihren ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren abgeleitet. Die P–N-Bindung in 5 und 27 ist acidolysebeständiger als in den entsprechenden Verbindungen mit P=O-Gruppierung.

Reactions of Aminonucleosides with Thiophosphorylating Reagents

The reactions of 3'-amino-3'-deoxyadenosine (1) and of some derivatives with thiophosphoryl chloride and with thionophosphoric acid chloridebis(*p*-nitrophenylester), respectively, is described together with the syntheses of the 3'-amido analogues 5 and 9 and the 3',5'-diamido analogue 27 of adenosine 2',3'- and 3',5'-cyclothionophosphate, respectively. 5, 9 and 27 are formed as mixtures of diastereomers which are separated by chromatography. The reactions of the cAMP analogues and those of 3 and 23 with diazomethane is investigated. The structures of the new compounds are derived mainly from their ¹³C and ³¹P NMR spectra. The P–N bonds in 5 and 27 are less susceptible to acidolysis than they are in the corresponding compounds having P=O groups.

Kürzlich haben wir über die Synthese von 3'-Amido-Analoga des Adenosin-3',5'-cyclophosphats (cAMP) berichtet^{1,2}. Dabei fanden wir, daß die P–N-Bindung im schwach sauren und neutralen pH-Bereich von geringer Stabilität ist.

Vom biologischen und pharmakologischen Standpunkt wäre es wünschenswert, diese Bindung zu stabilisieren. Der Ersatz des 5'-Sauerstoffs durch Schwefel erbrachte dabei eine bedeutende Stabilitätssteigerung der P–N-Bindung³. Der einleitende Schritt für die Hydrolyse der P–N-Bindung ist die Protonierung des Amidstickstoffs⁴. Durch Substitution an diesem Stickstoff und Ersatz von P=O durch P=S hofften wir Verbindungen zu erhalten, die im physiologischen pH-Bereich völlig stabil sind. Der Ersatz von P=O durch P=S würde eine Erhöhung der Elek-

¹) M. Morr, M.-R. Kula, G. Roesler und B. Jastorff, *Angew. Chem.* **86**, 308 (1974); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **13**, 280 (1974).

²) M. Morr, M.-R. Kula und L. Ernst, *Tetrahedron* **31**, 1619 (1975).

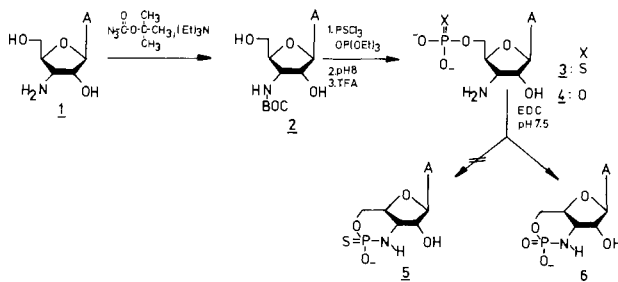
³) M. Morr, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2127.

⁴) A. J. Kirby und S. G. Warren, *The Organic Chemistry of Phosphorus*, 1. Aufl., S. 295, Elseviers Publ. Comp., Amsterdam, London, New York 1967.

tronendichte am Phosphor nach sich ziehen. So erzielten *Jastorff et al.* bei 5'-Amido-Analoga des cAMP beim Ersatz von P=O durch P=S eine im physiologischen pH-Bereich völlig stabile Verbindung⁵⁾.

In dieser Arbeit berichten wir über die Umsetzung von Aminonucleosiden, insbesondere des 3'-Amino-3'-desoxyadenosins (**1**) und dessen Derivaten mit Thiophosphorylierungsreagenzien, wie Thiophosphorylchlorid und Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester), mit dem Ziel, stabile Analoge des Adenosin-3',5'-cyclophosphats mit Stickstoffatomen im Cyclophosphatring und doppelt gebundenem Schwefel am Phosphor (Thion-Form) zu erhalten.

Zunächst wurde **1** nach bekannter Methode⁶⁾ durch Einführung der *tert*-Butyloxy-carbonyl-Schutzgruppe (BOC) in das 3'-*N*-BOC-Derivat **2** umgewandelt und mit Thiophosphorylchlorid in Phosphorsäure-triethylester umgesetzt⁷⁾.



Nach der Hydrolyse bei pH 8 und Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit wasserfreier Trifluoressigsäure wurden unter teilweiser Entschwefelung am Phosphor die Verbindungen **3** und **4** erhalten. Beide Nucleotide lassen sich gut an einem Anionenaustauscher (Acetat-Form) trennen. Nach der Feinreinigung von **3** an einem DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher wurde die Cyclisierung mit wasserlöslichem Carbodiimid [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid, EDC] nach bekannter Methode durchgeführt²⁾. Man erhält nicht das erwartete Cyclisierungsprodukt **5**, sondern in guten Ausbeuten Verbindung **6**, da bei der Cyclisierung eine vollständige Entschwefelung stattfindet. Über ähnliche Entschwefelungs-Reaktionen wurde in der Literatur berichtet^{8, 9)}.

Wir untersuchten weitere Möglichkeiten, um von dem unsubstituierten Aminonucleosid **1** bzw. dessen *N*-substituierten Derivaten¹⁰⁾ direkt zu den 3',5'-cAMPs-Analogen zu gelangen. Bei der allgemein üblichen Phosphorylierung bzw. Thiophosphorylierung von Nucleosiden in Phosphorsäure-trialkylester mit Phosphorochlorid

⁵⁾ *B. Jastorff und T. Krebs*, Chem. Ber. **105**, 3192 (1972).

⁶⁾ *J. M. Stevart und J. D. Young*, Solid Phase Peptide Synthesis, S. 29, W. H. Freeman u. Co., San Francisco 1969.

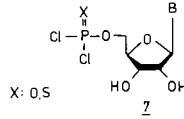
⁷⁾ *K. Haga, M. Kainosho und M. Yoshikawa*, Bull. Chem. Soc. Jpn. **44**, 460 (1971).

⁸⁾ *F. Eckstein*, Tetrahedron Lett. **1967**, 1157.

⁹⁾ *M. Mikolajczyk*, Chem. Ber. **99**, 2083 (1966).

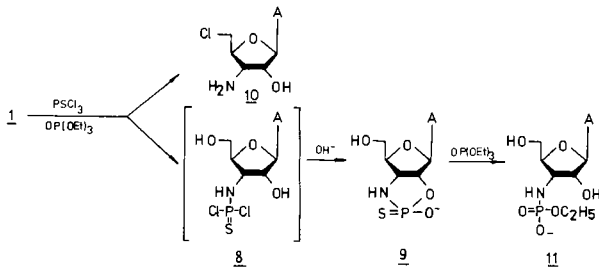
¹⁰⁾ Über die Darstellung der *N*-alkyl- bzw. *N*-aryl-substituierten Aminonucleoside wird in einer anderen Arbeit berichtet.

bzw. Thiophosphorylchlorid nach *Yoshikawa* wird Verbindung **7** als Zwischenprodukt formuliert ¹¹⁾.



Wenn 3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**1**) unter ähnlichen Bedingungen mit gleichen Zwischenstufen reagieren sollte, würde man unter alkalischen Bedingungen einen Ring-schluß zum gewünschten 3',5'-Derivat erhalten. Unsere Untersuchungen ergaben jedoch, daß bei den 3'-Aminonucleosiden die Phosphorylierung anders verläuft: sie erfolgt am Stickstoffatom unter Bildung der nicht isolierten Zwischenverbindung **8**. Bei dessen alkalischer Hydrolyse findet bevorzugt eine 2',3'-Cyclisierung zu **9** statt. Außerdem erhielt man durch Austausch der 5'-Hydroxylgruppe gegen Chlor als Nebenprodukt Verbindung **10**. Diese Nebenreaktion wurde bei ähnlichen Reaktionen auch von anderen Autoren beobachtet ^{11, 12)}.

Die von *Yoshikawa* et al. ¹³⁾ formulierte Schutzgruppenwirkung der Phosphorsäure-trialkylester auf die *cis*-Diolgruppierung gilt also nicht für eine *cis*-Amino-Hydroxyl-Gruppierung.



Ein weiteres Reaktionsprodukt bei der alkalischen Hydrolyse von **8** ist *N*-(3'-Desoxy-3'-adenosyl)phosphorsäure-monoethylester-amid (**11**), das vermutlich durch Alkylierung von **9** mit Phosphorsäure-triethylester und anschließende Eliminierung von Ethylmercaptan sowie Spaltung der 2'-O-P-Bindung entsteht.

Die Strukturaufklärung von **9** bereitete zunächst Schwierigkeiten, da der Periodat-Benzidin-Test ¹⁴⁾ auf vicinale Hydroxylgruppen, der – wie wir feststellen konnten – auch auf *cis*-ständige Amino- und Hydroxylgruppen anwendbar ist, immer positiv ausfiel und damit eine nichtphosphorylierte 2',3'-*cis*-Amino-Hydroxyl-Gruppierung vortäuschte. Gleiches Verhalten fand man auch beim 2',3'-Cyclouridin-thionphosphat ¹⁵⁾, sowie beim 3',5'-Cyclodiamid der 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-amidthionphosphorsäure (**27**).

¹¹⁾ K. Kusashio und M. Yoshikawa, Bull. Chem. Soc. Jpn. **41**, 142 (1968).

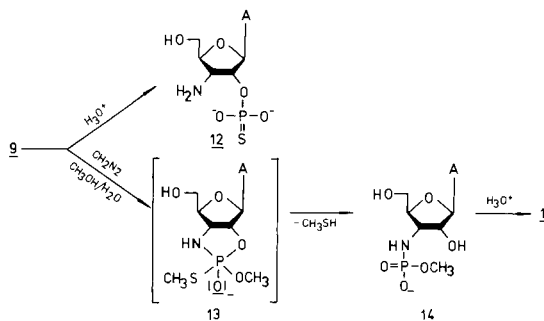
¹²⁾ M. Morr und M.-R. Kula, Tetrahedron Lett. **1974**, 23.

¹³⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Bull. Chem. Soc. Jpn. **42**, 3505 (1969).

¹⁴⁾ J. A. Cifronelli und F. Smith, Anal. Chem. **26**, 1132 (1954).

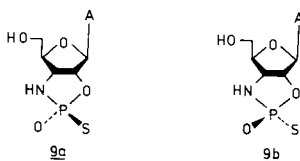
¹⁵⁾ Für die Überlassung einer Probe danken wir Herrn Prof. Dr. F. Eckstein, Göttingen.

Die Konstitution **9** konnte eindeutig durch die ^{31}P - und ^{13}C -NMR-Spektren bestimmt werden. Ein weiterer Beweis waren Folgereaktionen wie Spaltung mit Säure zu Verbindung **12** und die Reaktion mit Diazomethan. Bei der Spaltung der P–N-Bindung von **9** bei pH 5 erhielt man das 2'-Thionphosphat **12**.



Durch erschöpfende Methylierung von **9** mit Diazomethan in wäßrig-methanolischer Lösung¹⁶⁾ erhielt man unter Abspaltung von Methylmercaptan in guten Ausbeuten Verbindung **14**. Als mögliche Zwischenstufe könnte Verbindung **13** mit pentakoordiniertem Phosphor angenommen werden. Verbindung **14** wurde von *Wiedner*¹⁷⁾ auf anderem Wege dargestellt. Zwischen pH 4 und 7 ist **14** beständig. Die Spaltung von **14** bei pH 3 ergibt **1**.

Die Thiophosphorylierungen von **1** in Pyridin nahmen den gleichen Verlauf. Man erhielt auch hier nur das 2',3'-Cyclo-Derivat **9**, allerdings mit weniger Nebenprodukten. Wegen der schlechten Löslichkeit von **1** in Pyridin wurde in großer Verdünnung gearbeitet. Die Hydrolyse des Zwischenproduktes **8** und Cyclisierung zu **9** fand in wäßriger Pyridin-Lösung bei pH 9.5 statt. Die bei der Reaktion entstehenden Diastereomere, die *exo*- und die *endo*-Form, **9a** und **9b**, lassen sich auf einer DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher-Säule trennen.



Nach *Eckstein* würde die ^{31}P -Verschiebung von 79.6 ppm der *exo*-Verbindung^{18, 19)} entsprechen. Ein genauer Beweis der Struktur und Konfiguration müßte durch eine Röntgen-Strukturanalyse der kristallisierten Verbindung erbracht werden. Da die Thiophosphorylierung mit Thiophosphorylchlorid in Pyridin nicht das 3',5'-cAMPS-Analoge **5** lieferte, untersuchten wir den Einfluß eines *N*-Alkyl- bzw. *N*-Aryl-Substituenten auf die Cyclisierung.

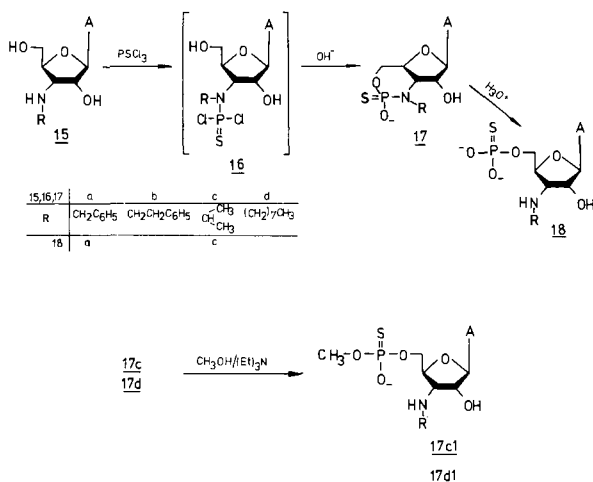
¹⁶⁾ *Organikum*, 9. Aufl., S. 598, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969.

¹⁷⁾ *H. Wiedner*, Dissertation, Univ. Konstanz 1975.

¹⁸⁾ *D. A. Usher, E. S. Erenrich und F. Eckstein*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 115 (1972).

¹⁹⁾ *H. H. Schulz*, Dissertation, Technische Univ. Braunschweig 1971.

Bei der Cyclisierung der nicht isolierten Zwischenverbindungen **16a–d** im alkalischen Medium trat ausschließlich 3',5'-Cyclisierung auf. Die besten Ausbeuten wurden bei der Cyclisierung von **15a** zu **17a** erhalten. Bei den anderen Substituenten **15b–d** verlief die Reaktion weniger gut, lediglich beim 3'-*N*-Isopropylderivat **15c** waren die Ausbeuten an **17c** noch zufriedenstellend. Die Bildungstendenz der Cycloderivate nimmt in der Reihe **15a** > **15c** > **15b** > **15d** deutlich ab. Die Cyclisierung von **15a, c** und **d** zu **17a, c** und **d** scheint stereospezifisch zu verlaufen, denn weder chromatographisch noch mit der ^{31}P -Kernresonanz ließen sich Diastereomere nachweisen. Durch die Substitution der 3'-Aminogruppe mit Alkyl- bzw. Aralkylgruppen wird wahrscheinlich die Konformation der Ribose verändert und damit eine Cyclisierung zur 5'-Hydroxylgruppe begünstigt. Zur Konstitutionsaufklärung von **17a** benutzte man die saure Hydrolyse zu **18a**.

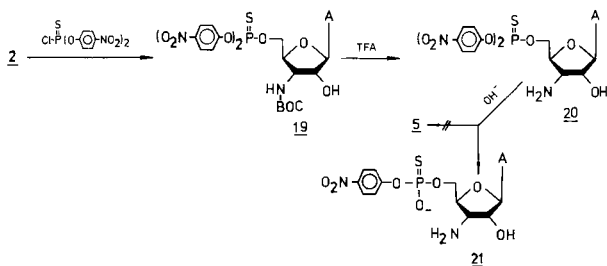


Bei mehrtägiger Reaktion der 3'-Alkylamino-3'-desoxynucleoside **15c** und **15d** mit Thiophosphorylchlorid in Pyridin, Hydrolyse bei pH 9–10 sowie Chromatographie an DEAE-Sephadex mit einem TEAB-Gradienten und mehrfaches Abziehen der Reste des Puffers bzw. Triethylamins mit Methanol (s. Exp. Teil), wurde Methanolyse der P–N-Bindung in der cyclischen Verbindung **17c** zu **17c1** beobachtet.

Als Nebenprodukt erhielt man das offene Thionphosphat **18c**. Die cyclische Verbindung **17c** ist nur faßbar, wenn man die Pufferreste durch mehrmaliges Abziehen mit Wasser entfernt.

Beim mehrstündigen Kochen von **17c** mit Methanol und Triethylamin wurde die gleiche Ringöffnung zu **17c1** beobachtet. Das Vorliegen einer P–N-Bindung ist ausgeschlossen, da **17c1** bei pH 1 mehrere Tage lang völlig stabil ist. **17c** wird bei pH 1 sofort zu **18c** gespalten. Das Octylderivat **17d** wurde ebenfalls methanolysiert, was sich im ^1H -NMR-Spektrum durch Erscheinen des P–O– CH_3 -Dubletts zu erkennen gibt. Bei den unsubstituierten Verbindungen und den Aralkylderivaten wurde keine Methanolyse unter den angegebenen Bedingungen (s. Exp. Teil) beobachtet.

Für die Synthese des 3'-*N*-unsubstituierten cAMPS-Analogen **5** wurde versucht, die Methode von *Borden* und *Smith*²⁰⁾ zu verwenden, die von *Jastorff*⁵⁾ und *Eckstein*²¹⁾ für cAMPS-Analoga modifiziert wurde. Als Schutzgruppe für die 3'-Aminogruppe in **1** wurde erneut die 3'-*N*-BOC-Gruppe gewählt, nachdem festgestellt worden war, daß eine 5minütige Behandlung des Thionphosphorsäure-tris(*p*-nitrophenylester) mit Tri-fluoressigsäure keine Entschwefelung und Abspaltung von *p*-Nitrophenol erwirkte. Die in Pyridin mit Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester) durchgeführte Veresterung lieferte nach Chromatographie an Kieselgel die einheitliche Substanz **19**, die durch MS und NMR eindeutig charakterisiert wurde.



Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit TFA lieferte das Zwischenprodukt **20**, das durch Fällung mit Ether isoliert wurde. Die anschließenden Cyclisierungsversuche zu **5** wurden u. a. in Methanol/konz. Ammoniak und Dimethoxyethan/1 N NaOH²²⁾ ausgeführt. Die Strukturaufklärung durch ¹H-, ³¹P- und ¹³C-Spektren zeigte aber, daß wider Erwarten nicht **5** sondern durch Hydrolyse **21**, als Diastereomergemisch, entstanden war. Reaktionsbedingungen, wie sie bei der Peptidsynthese aus aktivierten *p*-Nitrophenylestern mit Aminogruppen üblich sind (DMF/Triethylamin) führten auch nur zum Diester **21**. Selbst die Umsetzung von **20** in DMF mit frisch vorbereitetem Kalium-*tert*-butylat führte nur zum Diester.

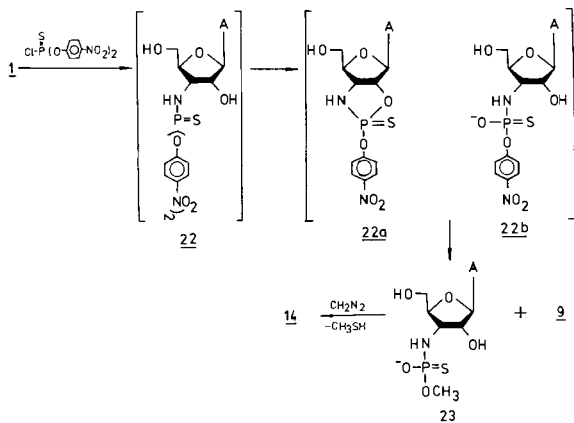
Einen überraschenden Verlauf nahm die Umsetzung von **1** in Dimethylformamid mit Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester) in Gegenwart von Hünig-Base. Bei diesem Eintopfverfahren konnte der Methyl ester **23** mit chiraalem Phosphoratom neben **9** isoliert werden.

Das nicht isolierte Zwischenprodukt **22**, welches sehr schnell entsteht, reagiert je nach Reaktionsbedingungen (Lösungsmittelmenge, Base, Temperatur) zu den Diastereomergemischen von **23** und **9**. Beide Verbindungen lassen sich gut auf einer DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher-Säule trennen. **23** konnte durch das ¹H-, ¹³C- und ³¹P-Spektrum eindeutig charakterisiert werden. Das Auftreten der Methylgruppe in Verbindung **23** ist möglicherweise so zu erklären, daß die bei der Chromatographie des Reaktionsansatzes an Kieselgel mit methanolhaltigen Laufmitteln nicht isolierten reaktionsfähigen Zwischenverbindungen **22a** bzw. **22b** mit Methanol reagieren. Ein Methylgruppentransfer aus dem DMF sollte dagegen ausgeschlossen sein. **23** reagiert mit Diazomethan unter Entschwefelung zu **14**.

²⁰⁾ R. K. Borden und M. Smith, J. Org. Chem. **31**, 3241 (1966).

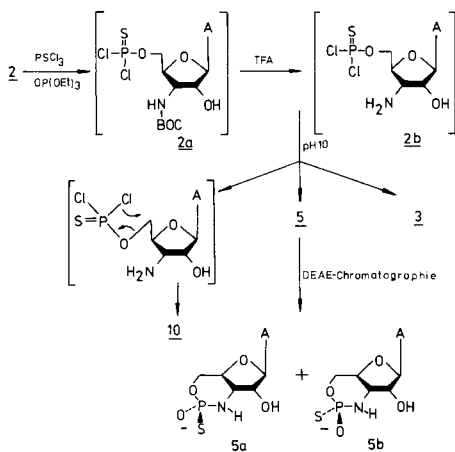
²¹⁾ F. Eckstein, L. P. Simonson und H. P. Bär, Biochemistry **13**, 3806 (1974).

²²⁾ B. Jastorff, Univ. Bremen, persönl. Mitteilung 1976.



Bei der Aufklärung der Wirkungsweise des Enzyms Pankreas-Ribonuclease A konnten Eckstein et al. eine ähnliche Verbindung isolieren. So wurde Uridin-2',3'-cyclothionphosphat mit Pankreas-Ribonuclease A in Gegenwart von Methanol als Nucleophil umgesetzt und ein am Phosphoratom asymmetrischer Methylester, der Uridin-3'-thionphosphorsäure-methylester, isoliert^{23, 24)}.

Da bisher alle Methoden für die Darstellung des cyclischen Derivates 5 scheiterten, versuchten wir, das bei der Thiophosphorylierung von 2 mit PSCl_3 und nach Abspaltung der 3'-N-BOC-Schutzgruppe aus 2a entstandene reaktive Dichlorothionphosphorsäureprodukt 2b bei pH 10 zu cyclisieren.



Mit der Cyclisierung zu 5, die etwa in 25–35proz. Ausbeute abläuft, konkurrieren zwei weitere Reaktionen. Durch intramolekulare Umlagerung des Dichloroproduktes erhält man das 5'-Chlorderivat 10, wie es auch von Yoshikawa et al. beobachtet wurde.

²³⁾ W. Saenger und F. Eckstein, J. Am. Chem. Soc. **92**, 4712 (1970).

²⁴⁾ F. Eckstein, W. Saenger und D. Suck, Biochem. Biophys. Res. Commun. **46**, 964 (1972).

Die zweite Nebenreaktion ist die Hydrolyse des Dichlorproduktes zum 5'-Thionphosphorsäurederivat **3**. Als geringe Nebenprodukte erhält man durch Entschwefelung **4** und **6**. Alle Reaktionsprodukte konnten gut auf einer DEAE-Sephadex-Säule abgetrennt werden (s. Abb. 1).

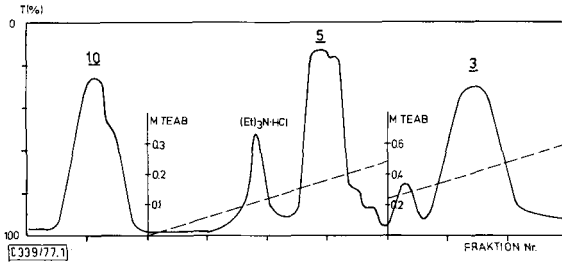


Abb. 1. Elutionsdiagramm für die Trennung der Reaktionsprodukte aus der Reaktion von **2** mit Thiophosphorylchlorid, anschließende Abspaltung der 3'-N-BOC-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure und alkalische Hydrolyse; an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3 -Form, 40×2.5 cm) mit einem Wasser/Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer-Gradienten

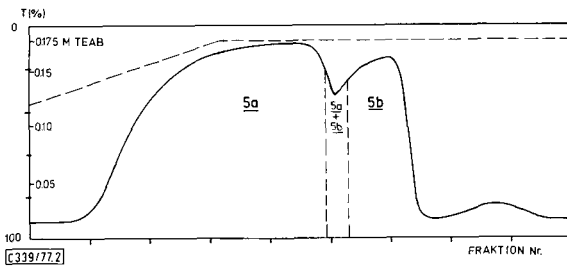


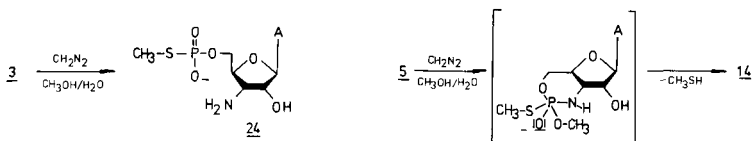
Abb. 2. Elutionsdiagramm für die Trennung der Diastereomeren von **5** in **5a** und **5b** an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3 -Form, 50×5 cm) mit einem Wasser/Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer-Gradienten

Die Diastereomeren von **5** (Verhältnis 80:20) lassen sich an einer DEAE-Sephadex-Säule bzw. Aluminiumoxid, LM.G (s. Exp. Teil), gut trennen (Abb. 2).

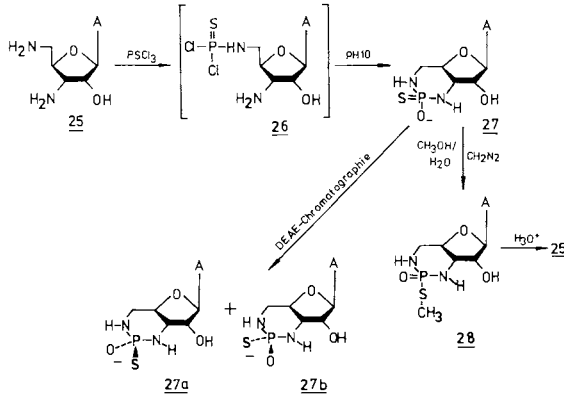
Es ist denkbar, daß während der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit wasserfreier Trifluoressigsäure unter den angegebenen Reaktionsbedingungen ein reaktionsfähiges, gemischtes Anhydrid aus Trifluoressigsäure und dem Monoester der Thionphosphorsäure entsteht.

Als weitere Umsetzung untersuchten wir die Reaktion von **3** und **5** mit Diazomethan.

3 reagiert mit einem Überschuß von Diazomethan unter Methylierung des Schwefels zu **24**. **5** reagiert wie bei der Umsetzung von **9** mit Diazomethan zum gleichen Produkt **14**. Hier wurde auch nicht die P-N-Bindung, sondern die 5'-O-P-Bindung gespalten.



Für die Darstellung von **27**, dem Bis-Amido-Derivat des cAMPS, erwies sich die Umsetzung von **25** in Pyridin mit Thiophosphorylchlorid und anschließende Hydrolyse bei pH 10 als eine sehr einfache Methode²⁵⁾.



Es ist zu erwarten, daß der Angriff des Thiophosphorylchlorids auf die 5'-Aminogruppe unter Bildung der nicht isolierten Zwischenverbindung **26** erfolgt. 2,3'-Cyclothionphosphat wurde nicht als Nebenprodukt beobachtet. Daß sich die 5'-Aminogruppe chemisch deutlich von der ringgebundenen 3'-Aminogruppe unterscheidet, ist auch aus der Reaktion mit Ninhydrin ersichtlich. Die 5'-Aminogruppe reagiert beim Erwärmen sofort unter intensiver Violettfärbung, während die 3'-Aminogruppe erst nach längerem Erhitzen durch eine schwach bräunliche Färbung erkennbar ist.

Das Diastereomergemisch von **27** ließ sich an einer DEAE-Sephadex-Säule in die Stereoisomeren, die *exo*- und die *endo*-Form, auftrennen. Im Gegensatz zum offenen und schwefelfreien Nucleosid-5'-phosphordiamidat²⁶⁾ erwies sich **27** im physiologischen pH-Bereich als stabil. Nach mehreren Stunden bei pH 5 und 37°C ging **27** in das 3',5'-Diamino-dideoxyadenosin (**25**) über. **27** reagiert mit Diazomethan nicht unter Ringöffnung. Es wird lediglich eine Methylierung des Schwefels zu **28** beobachtet. Im Säuren wird **28** zum Diaminoprodukt **25** gespalten.

Die Konstitution **28** wurde eindeutig belegt durch das ^1H -, ^{31}P -, Massen-Spektrum sowie das elektrophoretische und chromatographische Verhalten. Keine Beweglichkeit im Puffersystem pH 8 und pH 10 sowie die Wanderung auf DC-Kieselgel (LM: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 8:2) sprechen für eine ungeladene Verbindung.

In Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen werden die synthetisierten Verbindungen biologisch getestet.

NMR-Spektroskopische Untersuchungen

Die Konstitutionssicherung der hergestellten Verbindungen erfolgte hauptsächlich durch ^1H -, ^{13}C - und, falls anwendbar, durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie. In den ^1H -NMR-Spektren (s. Exp. Teil) sind neben den Protonen der Basen und eventueller Ester- bzw.

²⁵⁾ Über die Darstellung des 3', 5'-Diamino-dideoxyadenosins (**25**) wird an anderer Stelle berichtet.

²⁶⁾ A. Simoncsits und J. Tomasz, Nucleic Acid Res. **2**, 1223 (1975).

Tab. 1. ^{13}C -Chemische Verschiebungen δ einiger Nucleoside und Nucleotide^{a)}

Verb.	δ_2	δ_4	δ_5	δ_6	δ_8	$\delta_{1'}$	$\delta_{2'}$	$\delta_{3'}$	$\delta_{4'}$	$\delta_{5'}$	δ_{sonstige}
1	153.4	149.1	119.7	156.2	141.3	90.4	73.3	52.7	83.2	62.2	
3	153.8	149.3	119.4	156.3	140.9	90.0	74.8	53.0	82.4	64.4	
5a	153.8	149.0	119.5	156.2	140.4	92.39	74.97	59.22	75.23	68.91	
5b	153.8	149.0	119.5	156.2	140.4	93.10	75.10	60.33	75.75	68.84	
9a	153.8	149.2	119.7	156.4	141.7	90.24	84.71	58.79	87.76	62.38	
9b	153.8	149.2	119.7	156.5	141.7	90.22	84.04	58.80	87.43	62.60	
10	152.6	149.5	119.5	155.4	141.3	90.1	73.6	53.2	81.2	45.2	
11	153.7	149.2	119.7	156.5	140.9	90.5	75.6	54.1	85.2	61.8	Ethyl: 62.5 (CH ₃), 16.9 (CH ₃)
12	153.6	149.8	120.1	156.6	142.2	89.6	76.2	52.5	83.8	62.5	Methyl: 53.1
14	153.7	149.3	119.7	156.5	140.9	90.5	75.6	54.0	85.2	61.7	Phenyl: 139.5–140.0 (C-1 ^b), 129.9, 129.4 (C-2 und C-3), 128.4 (C-4), CH ₂ : 52.7
17a	153.8	148.9	119.7	156.4	140.1	93.2	74.8	65.8	75.6	68.0	iPr: 49.9 (CH); 23.3, 22.7 (CH ₃)
17c	153.9	149.1	119.7	156.4	140.4	92.9	75.3	60.6	75.7	67.0	Benzyl: 139.9 (s), 129.9 (o + m)
18a	153.8	149.5	119.9	156.6	141.4	90.4	74.6	59.4	84.2	65.5	128.8 (p), 52.5 (CH ₃)
19^{e)}	152.7	148.6	119.6	155.7*	138.7	91.0	73.9	51.8	82.0**	69.1	BOC: 155.8* (CO), 80.7** (quart. C), 28.3 (CH ₃)
20^{d)}	150.8	150.2	121.0	156.0	143.2	92.7	73.8	52.7	81.3	69.6	Aromat: 154.6 (1''), 121.8 (2''), 125.6 (3''), 145.3 (4'')
21^{e)}	153.7	149.4	119.2	156.1	140.6	89.92 } 89.69 }	75.9 } 69.69 }	53.4 } 66.28 }	84.5 } 66.06 }	66.28 } 66.06 }	Aromat: 156.2 (1''), 123.2 (2''), 126.8 (3''), 146.9 (4'')
23	153.7	149.2	119.7	156.4	140.8	90.5	75.40 } 75.15 }	54.2 } 55.3 }	85.03 } 84.93 }	61.6 } 42.8 }	Aromat: 158.0 (1''), 122.1/121.9 (2''), 126.1 (3''), 144.0 (4'')
25	153.7	149.2	119.9	156.4	141.3	91.3	75.5	55.3	81.4	42.8	Methyl: 53.36 } 53.28 }
27a	153.9	149.1	119.6	156.4	140.5	91.62	75.52	59.55	77.27	45.67	
27b	153.9	149.1	119.6	—	140.5	92.33	75.45	60.64	77.69	45.44	

^{a)} Standard: externes TMS, Lösungsmittel: D₂O, falls nicht anders angegeben.

^{b)} Die chem. Verschiebung von Phenyl-C-1 kann wegen der Anwesenheit von Signalen von Verunreinigungen nicht genauer angegeben werden.

^{c)} Standard: internes TMS, Lösungsmittel: CDCl₃, Zuordnung innerhalb der mit * bzw. ** bezeichneten Signalarpaare ist umkehrbar.

^{d)} Lösungsmittel und interner Standard: CD₃OD ($\delta = 49.3$). Abgesehen von Aufspaltungen durch Kopplung mit ³¹P sind Signalverdopplungen für C-1' und C-2' (Aromat) sowie für C-8 zu beobachten. Eine Erklärung hierfür steht noch aus.

^{e)} Diastereomerenmisch (chirales P-Atom).

Tab. 2. ^{31}P -Chemische Verschiebungen δ^a) und ^{13}C - ^{31}P -Spin-Kopplungskonstanten b) $J_{\text{P,C}}$ einiger Nucleotide

Verbindung	δ_{P}	$J_{\text{P,C-1'}}$	$J_{\text{P,C-2'}}$	$J_{\text{P,C-3'}}$	$J_{\text{P,C-4'}}$	$J_{\text{P,C-5'}}$	sonstige $J_{\text{P,C}}$
3	44.0	—	—	—	9.0	3.4 ± 1.0	
5a	57.5	—	9.8	4.9	6.5	9.3	
5b	59.0	—	11.6	1.7	5.1	6.8	
9a	79.6	4.8	≈ 0	3.7	3.0	—	
9b	76.6	4.7	≈ 0	2.7	4.8	—	Ethyl: CH_2 5.7, CH_3 7.5
11	7.1	—	3.5	≈ 0	7.7	—	
12	44.9	6.7	3.8	≈ 0	—	—	
14	8.3	—	2.9	≈ 0	7.8	—	Methyl: 5.0
17a	62.4	—	10.2	≈ 0	≤ 3	6.7	
17c	—	—	12.9 ^{e)}	≈ 0	6.1 ^{e)}	7.4	iPr-Methyl: 3.2 u. 12.2; iPr-Methin: ≈ 0
17c1	57.1	—	—	—	—	—	
18a	43.5	—	—	—	9.4	4.4	
18c	43.4	—	—	—	—	—	
19 ^{e)}	55.8	—	—	—	—	—	
20	55.3	—	—	—	8.6	5.5	Aromat: C-1'' 6.8, C-2'' 6.2
21 ^{d)}	52.0 } 51.4 }	—	—	—	9.0	5.6	Aromat: C-1'' 7.0, C-2'' 5.0
23 ^{d)}	59.00 } 58.94 }	—	3.0 } 3.1 }	≈ 0	7.9 } 8.0 }	—	Methyl: $\left. \begin{matrix} 6.0 \\ 6.1 \end{matrix} \right\}$
24	22.6	—	—	—	—	—	
27a	53.7	—	8.6	4.3	7.9	5.7	
27b	58.9	—	11.2	1.2	5.3	3.6	
28 ^{d)}	34.8 } 42.1 }	—	—	—	—	—	

a) In ppm zu niedriger Feldstärke (hoher Frequenz) relativ zu ext. H_3PO_4 .

b) In Hz, Genauigkeit i. allg. ± 0.5 Hz; bei 5a, 5b, 27a und 27b ± 0.25 Hz. Für C-Atome, die zwei oder drei Bindungen vom P-Atom entfernt sind, jedoch bei normaler digitaler Auflösung der Spektren (ca. 1 Hz/Kanal) keine Signalaufspaltungen zeigen, ist die Kopplungskonstante ≈ 0 angegeben.

c) Keine Angabe für $J_{\text{P,C}}$ wegen verbreiteter Signale.

d) Diastereomerengemisch (chirales P-Atom).

e) Eine andere Paarung der vier dicht beieinander liegenden Signale für C-2' und C-4' ergibt $J_{\text{P,C-2'}} = 10.3$ Hz und $J_{\text{P,C-4'}} = 3.5$ Hz.

f) In CD_3OD 30.1 und 38.2.

Amidgruppen am Phosphor vom Ribose-Teil der Moleküle nur 1'-H und, in manchen Fällen, 2'-H eindeutig zuzuordnen, da, vor allem in den Cyclonucleotiden, die Zuckerprotonen komplexe Spinsysteme bilden, die ohne detaillierte Spektrensimulation nicht interpretierbar sind. Besonderes Gewicht kommt deshalb den ^{13}C - (Tab. 1) und ^{31}P -NMR-Daten (Tab. 2) zu.

Die chemische Umgebung der Phosphoratome in den Nucleotiden läßt sich aus der ^{31}P -Verschiebung ableiten: in den Phosphaten bzw. Phosphoramiden, $\text{O}=\text{P}(\text{OR})_2\text{Z}$, mit $\text{Z} = \text{OR}$ bzw. NHR , liegt δ_{P} zwischen 0 und 10; das Thiolphosphat **24** mit einfach gebundenem Schwefel absorbiert bei $\delta_{\text{P}} = 23$, das Diamidthiolphosphat **28** bei $\delta_{\text{P}} = 30$; die Resonanzen der Thionphosphate und der abgeleiteten Amide findet man zwischen $\delta_{\text{P}} = 40$ und 80. In cyclischen Thionphosphoramiden ist aus den ^{31}P -Verschiebungen außerdem deutlich zu erkennen, ob fünf- oder sechsgliedrige Ringe vorliegen; wie bei den analogen Cyclo-oxophosphaten ist der ^{31}P -Kern im fünfgliedrigen um ca. 20–25 ppm gegenüber dem ^{31}P -Kern im sechsgliedrigen Ring entschirmt²⁷⁾. Dieser Effekt wurde auf Änderungen der OPO-Bindungswinkel zurückgeführt²⁸⁾.

Die Verknüpfungsstelle der phosphorhaltigen Gruppe mit der Ribose-Einheit ist leicht aus den ^{31}P , ^{13}C -Kopplungskonstanten abzuleiten, da Spinkopplungen dieser Art über mehr als drei Bindungen in gesättigten Verbindungen im allgemeinen nicht beobachtbar sind²⁹⁾, so daß nur $^2J_{\text{PC}}$ - und $^3J_{\text{PC}}$ -Kopplungen in den ^{13}C -Spektren erscheinen, wobei allerdings die $^2J_{\text{PC}}$ bisweilen so klein sein können, daß sie unter normalen experimentellen Bedingungen nicht aufgelöst werden. Die ^{31}P , ^{13}C -Kopplungen geben ebenfalls darüber Aufschluß, ob es sich bei einer Verbindung um ein offenes oder ein cyclisches Phosphat bzw. Phosphoramid handelt, da aus dem geschilderten Grunde nur in den Cyclo-Verbindungen mehr als zwei ^{13}C -Signale durch Spin-Kopplung mit dem ^{31}P -Kern aufgespalten sein können. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Cyclisierung sind die bereits früher diskutierten Verschiebungsänderungen²⁾, die vor allem diejenigen Kohlenstoffatome erfahren, die Teil des neugebildeten Ringes sind.

Schließlich ist zu bemerken, daß die getrennten Diastereomeren der Cyclonucleotide **5**, **9** und **27** sich jeweils in den chemischen Verschiebungen sämtlicher Ribose-Kohlenstoffatome unterscheiden. Ohne Vergleichsmaterial läßt sich aus diesen Verschiebungen jedoch nicht die Konfiguration des Phosphoratoms ableiten. Auch die ^{31}P -Verschiebungen sind für die einzelnen Diastereomeren unterschiedlich ($\Delta\delta_{\text{P}} = 1.5$ ppm in **5a/5b**, 3.0 ppm in **9a/9b** und 5.2 ppm in **27a/27b**). In Analogie zu den Ergebnissen der ^{31}P -NMR- und ORD-Untersuchungen von Usher et al.¹⁸⁾ an den Diastereomeren des mit **9** verwandten Uridin-2,3'-cyclophosphorothioats sollte dasjenige Diastereomere von **9**, dessen ^{31}P -Kern stärker abgeschirmt ist, ein *endo*-ständiges Schwefelatom besitzen.

Frau Dr. M.-R. Kula danken wir für das Interesse und die Förderung dieser Arbeit. Unser Dank gilt auch Herrn K. Heidebrecht für ausgezeichnete technische Assistenz.

²⁷⁾ G. M. Blackburn, J. S. Cohen und I. Weatherall, *Tetrahedron* **27**, 2903 (1971).

²⁸⁾ D. G. Gorenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 898 (1975).

²⁹⁾ I. C. P. Smith, H. H. Mantsch, R. D. Lapper, R. Deslauriers und T. Schleich, *Proceedings of the Fifth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry* (E. Bergmann und B. Pullman, Herausg.), Bd. 5, S. 381. Academic Press, New York 1973. Zur Reichweite von ^{31}P , ^{13}C -Spinkopplungen vgl. L. Ernst, *Org. Magn. Reson.* **9**, 35 (1977).

Experimenteller Teil

Die UV-Spektren wurden in Methanol mit dem Zeiss DMR 21 Spektralphotometer gemessen. Die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit dem Gerät Varian XL-100-12 bei 100.06 bzw. 40.50 MHz aufgenommen, die ^{13}C -NMR-Spektren mit dem XL-100-12 bei 25.16 MHz oder mit dem Varian CFT-20 bei 20.00 MHz. Alle Aufnahmen erfolgten im Puls-Fourier-Transformations-Modus. Das Lösungsmittel war D_2O , falls nicht anders angegeben; der pD-Wert lag zwischen 8 und 10 außer bei **1**, **10** und **25**, die aus Löslichkeitsgründen als Hydrochloride gemessen werden mußten. Die Genauigkeit der chemischen Verschiebungen innerhalb eines ^1H -Spektrums beträgt 0.01 ppm, beim Vergleich verschiedener Spektren sind Abweichungen von 0.1 ppm möglich, da die Verschiebungen relativ zum Spektrometer-Offset bestimmt und auf externes TMS umgerechnet wurden (Lock: D_2O). Die Massenspektren wurden mit dem AEI-Modell MS-9 bei 70 eV gemessen. Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Mikroheiztisch bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden von den Firmen I. Beetz (Kronach) bzw. I. Beller (Göttingen) angefertigt. Aus bislang ungeklärten Gründen lagen die gefundenen N-Gehalte bei den geladenen Verbindungen z. T. um bis zu 2% unter den berechneten Werten, obwohl die Werte für die anderen Elemente i. allgem. befriedigend mit der Erwartung übereinstimmten. Zur Erkennung des 3'-Amino-3'-desoxyadenosins bzw. 3',5'-Diamino-3',5'-didesoxyadenosins auf Dünnschichtplatten diente das 0.1 proz. Ninhydrin-Sprühreagenz der Firma Merck. Vicinale Amino- und Hydroxylgruppen wurden mit dem Benzidin-Natriummetaperiodat-Reagenz nachgewiesen¹⁴⁾. Zum Nachweis des Schwefels in Derivaten mit der P=S-Gruppierung und mindestens einer negativen Ladung diente auf Dünnschichtplatten ein Sprühreagenz, bestehend aus 1 g Natriumazid, 1 g löslicher Stärke auf 100 ml Wasser, versetzt mit einigen Kriställchen Iod bis zur bleibenden Blaufärbung⁵⁾. Man erhält damit weiße Flecken auf blauem Grund. Zur Identifizierung der Nitrophenylgruppen tüpfelte man mit 1 N NaOH und erwärmte auf 100°C (Gelbfärbung). Dünnschichtchromatographie: Für analytische Zwecke wurden Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator 254 nm auf Aluminium, Schichtdicke 0.2 mm (Riedel de Haen) bzw. DC-Alufolien, Aluminiumoxid 150 F 254, neutral (Typ T), Schichtdicke 0.2 mm (Merck), für präparative Trennungen PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254, Schichtdicke 2 mm (Merck) und selbstgestrichene Platten 200 × 20 cm mit Kieselgel HF 254 + 366 nach Stahl (Merck) Schichtdicke 1 mm, sowie DC-Fertigplatten Cellulose F (Merck) verwendet. Laufmittel (LM)-Systeme: Methanol A, Chloroform/Methanol (9:1) B, Chloroform/Methanol (7:3) C, Aceton/Benzol/Wasser (8:1:2) D, Aceton/Benzol/1 N Ammoniak/Wasser (8:2:0.5:0.5) E, Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2) F, n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (8:0.5:1.5) G, Ethanol/1 N Ammoniumacetat (7:3) H, Isobuttersäure/2 N Ammoniak/Wasser (122:72:2) I. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel 60 (Korngröße unter 0.063 mm) der Firma Merck, zur Ionenaustauscherchromatographie Dowex-Acetat (200–400 mesh) und DEAE-Sephadex A-25 (HCO_3^- -Form). Der Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (TEAB-Puffer) wurde aus frisch destilliertem Triethylamin (1 M in Wasser), Einleiten von CO_2 in der Kälte und Verdünnen auf die entsprechende Molarität sowie pH 7.5–8 bereitet. Die UV-absorbierenden Substanzen wurden mit einer LKB- bzw. ISCO-UV-Einheit kontinuierlich bei 254 nm gemessen und in Fraktionen aufgefangen. Die Ausbeuten wurden UV-spektroskopisch bestimmt.

Elektrophorese: Papier Schleicher & Schüll 2043bMgl, Laufmittel 0.05 M TEAB-Puffer pH 7.5. Die elektrophoretischen Beweglichkeiten (E) wurden bezogen auf Adenosin-3',5'-cyclophosphat = 1.

3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**1**)³⁰⁾: ^1H -NMR: δ = 8.15 und 7.93 (je 1 s, 8-H und 2-H), 5.96 (d, J = 4.5 Hz, 1'-H), 4.90 (t, J ca. 5 Hz, 2'-H), ca. 4.4 (m, 4'-H), ca. 4.1 (m, 3'-H), ca. 3.85 (m, 5'-H).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_3$ (266.3) Ber. C 45.11 H 5.30 N 31.57 Gef. C 44.83 H 5.68 N 31.39

³⁰⁾ Herrn Prof. Dr. F. Wagner, Abt. Biotechnologie der GBF, danken wir für die Bereitstellung von **1**.

3'-tert-Butyloxycarbonylamino-3'-desoxyadenosin (2): 1.0 g (3.76 mmol) **1** wurden durch kurzes Erhitzen in 25 ml wasserfreiem DMSO gelöst und nach dem Abkühlen mit 0.7 ml (5 mmol) frisch destilliertem Triethylamin und 0.55 ml (≈ 4 mmol) Azidoameisensäure-*tert*-butylester versetzt. Man rührte über Nacht bei 30°C und engte i. Ölpumpenvak. zur Trockne ein. Es wurde mehrmals mit Methanol aufgenommen und eingengt. Das entstandene Triethylammoniumazid ist flüchtig. Die Umsetzung ist quantitativ (1.35 g), die Substanz einheitlich (DC-Kieselgel, LM: A, D) und für weitere Umsetzungen genügend rein. Eine Feinreinigung ist über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 30, 250 g, 0.05–0.2 mm (Merck), aufgetragen in wenig Methanol und entwickelt mit Dichlormethan/Methanol 9:1) möglich.

$C_{15}H_{22}N_6O_5$ (366.4) Ber. C 49.23 H 6.05 N 22.94 Gef. C 48.87 H 6.49 N 22.80

3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (3): 270 mg **2** (0.73 mmol) in 15 ml frisch destilliertem Phosphorsäure-triethylester (PTE) wurden unter Feuchtigkeitsausschluß bei 0°C mit 370 μ l (3.6 mmol) frisch destilliertem Thiophosphorylchlorid versetzt. Man ließ für 12 h bei 4°C im Kühlschrank und gab danach den Ansatz bei Raumtemp. langsam in 100 ml Wasser. Mit einem pH-Stat (Radiometer, Kopenhagen) wurde durch Zugabe von 0.5 N NaOH die Lösung auf pH 8.5 gehalten. Nach der Hydrolyse wurde 5 mal mit je 50 ml Ether ausgeschüttelt und die Probe lyophilisiert. Anschließend trocknete man noch 2 d bei 40–50°C i. Ölpumpenvak. Zur Abspaltung der 3'-*N*-BOC-Schutzgruppe versetzte man mit 25 ml wasserfreier Trifluoressigsäure für 5 min bei Raumtemp. Es wurde i. Ölpumpenvak. abgezogen, 3 mal mit je 20 ml Methanol aufgenommen und erneut i. Vak. getrocknet. Man löste in wenig Wasser (pH 1) und stellte mit 1 N NaOH auf pH 11.5 ein. Nach dem Verdünnen auf 300 ml gab man die Lösung auf eine Dowex-Säule (Acetat-Form, 35 \times 2.5 cm), wusch mit Wasser und eluierte mit einem Wasser/0.1 N Essigsäure-Gradienten. Die nucleotidhaltigen Fraktionen wurden eingengt und aus Wasser lyophilisiert. Ausb. 130 mg **3** (50%), 40 mg **4**²⁾ als freie Säuren.

¹H-NMR von **3**: δ = 8.44 und 8.24 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.10 (d, J = 3.4 Hz, 1'-H), 4.92 (dd, J = 6.0 und 3.4 Hz), ca. 4.6 (m, 1H), ca. 4.3–4.1 (m, 3H). – UV: λ_{\max} = 259 nm. – R_F : 0.07 (F), 0.04 (H), 0.68 (I). – E: 1.98.

$C_{10}H_{15}N_6O_5PS \cdot 3 H_2O$ (416.4) Ber. C 28.84 H 5.08 N 20.19 P 7.44 S 7.70
Gef. C 29.38 H 4.88 N 20.36 P 7.78 S 7.26

Cyclisierung von 3 mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC): 120 mg (0.26 mmol) **3** als Triethylammoniumsalz (TEA-Salz) wurden in 100 ml Wasser gelöst und auf 37°C erwärmt. Innerhalb von 30 min wurde bei 0°C eine EDC-Lösung in 200- μ l-Portionen zugegeben. (EDC-Lösung: 200 μ l EDC in 5 ml Wasser wurden auf 0°C abgekühlt und durch Einleiten von CO₂ auf pH 7.5 eingestellt.)

Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LM: A) verfolgt. Durch Einleiten von CO₂ wurde pH 7.0 bis 7.5 gehalten. Nach 3 h wurde die Lösung auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 35 \times 2.5 cm) gegeben und mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.25 M TEAB-Puffer chromatographiert. Der Hauptpeak wurde eingengt, der Rückstand mehrmals mit Methanol abgezogen, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhielt 95 mg **6** (85%) als farbloses, amorphes Pulver.

¹³C-Kernresonanzspektren von **6** vgl. Lit. ²⁾. – UV: λ_{\max} = 259 nm. – R_F : 0.32 (F), 0.22 (H). – E: 0.94.

Umsetzung von 1 in Phosphorsäure-triethylester (PTE) mit Thiophosphorylchlorid: 133 mg (0.5 mmol) **1** wurden in der Siedehitze in 50 ml PTE gelöst und nach dem Abkühlen auf 0°C langsam mit 70 μ l (0.68 mmol) Thiophosphorylchlorid in 5 ml PTE versetzt. Man ließ noch 30 min im Eisbad und anschließend für 12 h bei Raumtemp. Nach der Hydrolyse in 150 ml Wasser bei pH 9 (pH-Stat mit 0.2 N NaOH) wurde 5 mal mit je 50 ml Ether ausgeschüttelt, auf 200 ml mit Wasser verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 \times 2.5 cm) gegeben.

Zunächst wurde mit Wasser wenig nicht umgesetztes **1** und 3'-Amino-5'-chlor-3',5'-didesoxyadenosin (**10**) eluiert. Mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.25 m TEAB-Puffer wurde *N*-(3'-Desoxy-3'-adenosyl)phosphorsäure-monoethylester-amid (**11**) und dann Verbindung **9** eluiert. **9** reagiert mit dem P=S-Reagenz positiv, **11** negativ. Beide Verbindungen sind chromatographisch einheitlich. Test mit Periodat-Benzidin: **11** negativ, **9** positiv. Ausb. 25 mg **10**, 32 mg **11**, 47 mg **9**. **9** wurde in Form zweier Diastereomerer erhalten. — ¹H-NMR: δ = 8.02 und 7.87 (je 1 s, 8-H und 2'-H), 6.04 (d, *J* = 3 Hz, 1'-H), ca. 5.1 (m, 2'-H), 4.3–3.8 (m, 3', 4', 5'-H). — UV: λ_{max} = 259 nm — R_F: 0.41 (F), 0.34 (H). — E: 0.90.

C₁₆H₂₈N₇O₄PS · 0.5 H₂O (454.5) Ber. C 42.28 H 6.43 N 21.58 P 6.82 S 7.06
TEA-Salz Gef. C 42.63 H 6.69 N 20.73 P 6.91 S 6.87

¹H-NMR von **11**: δ = 8.10 und 7.82 (je 1 s, 8-H und 2'-H), 5.84 (s, 1'-H), 4.36 (d, *J* ca. 4.5 Hz, 2'-H), 4.0–3.7 (m, 3', 4', 5'-H), 3.75 (quint, *J* = 7 Hz, OCH₂) 1.09 (t, *J* = 7 Hz, CH₃). — UV: λ_{max} 260 nm. — R_F: 0.48 (F), 0.41 (H). — E: 0.98.

C₁₂H₁₈N₆NaO₆P · H₂O (414.3) Ber. C 34.79 H 4.87 N 20.29 P 7.48
Gef. C 35.02 H 4.85 N 18.21 P 7.58

3'-Amino-5'-chlor-3',5'-didesoxyadenosin (**10**): UV: λ_{max} = 259 nm. — R_F: 0.60 (F), 0.57 (H), Chromatographie einheitlich im LM D und E.

C₁₀H₁₃ClN₆O₂ (284.7) Ber. C 42.18 H 4.60 Cl 12.45 N 29.52
Gef. C 42.22 H 4.86 Cl 12.20 N 30.18

Cycloamid der 3'-Amino-3'-desoxyadenosin-2'-thionphosphorsäure (**9**): 266 mg (1 mmol) **1** wurden in der Siedehitze in 600 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Nach dem Abkühlen tropfte man eine Lösung aus 120 µl (1.16 mmol) Thiophosphorylchlorid in 10 ml Pyridin hinzu. Man ließ über Nacht rühren und zog anschließend ca. 400 ml Pyridin ab. Die restliche Reaktionslösung tropfte man in 800 ml Eiswasser und hielt mit einem pH-Stat durch Zugabe von 0.2 N NaOH auf pH 9.5. Nach der Hydrolyse wurde das restliche Pyridin abgezogen, die wäßrige Lösung auf ca. 400 ml eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 × 2.5 cm) gegeben. Zunächst wurde mit Wasser gewaschen und dann mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.5 m TEAB-Puffer Verbindung **9** zwischen 0.18 und 0.25 m TEAB-Puffer eluiert. Der Peak wurde eingengt, 3 mal mit Methanol abgezogen und aus Wasser als farbloses, amorphes TEA-Salz lyophilisiert. Ausb. 388 mg **9** (87%) als salzfreies Produkt (triethylammoniumchlorid-frei). Verbindung **9** ließ sich an einer DEAE-Sephadex-Säule in die Diastereomeren **9a** und **9b** auftrennen: **9a** = 236 mg (≈ 68%), **9b** = 112 mg (≈ 32%).

3'-Amino-3'-desoxyadenosin-2'-thionphosphat (**12**): 200 mg (0.45 mmol) **9** als TEA-Salz wurden, in 50 ml Wasser gelöst, mit 0.2 N HCl auf pH 5 eingestellt. Nach 15 h Rühren bei Raumtemp. wurde der Ansatz auf pH 7.5 eingestellt, über eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 35 × 2.5 cm) gegeben und das offene Nucleotid **12** mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.5 m TEAB-Puffer eluiert. Nach Einengen des Hauptpeaks wurde 3 mal mit Methanol abgezogen und aus Wasser als farbloses, amorphes TEA-Salz lyophilisiert. Etwa 10% **9** wurden zurückerhalten. Ausb. 167 mg **12** (80%).

¹H-NMR: δ = 8.20 und 7.97 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.15 (d, *J* ca. 4.5 Hz, 1'-H), 5.22 (dt, *J*_{PH} = 11 Hz, *J*_{1'2'}} ≈ *J*_{2'3'}} ≈ 5 Hz, 2'-H), 4.28 (m, 4'-H), 4.08 (t, *J* = 6 Hz, 3'-H), ca. 3.8 (m, 5'-H). — UV: λ_{max} = 259 nm. — R_F: 0.09 (F), 0.06 (H). — E: 1.98.

C₁₀H₁₃N₆Na₂O₅PS · 2 H₂O (442.3) Ber. C 27.15 H 3.88 N 19.00 S 7.25
Gef. C 27.43 H 4.17 N 18.68 S 7.28

Umsetzung von **9** mit Diazomethan zum *N*-(3'-Desoxy-3'-adenosyl)phosphorsäure-monomethylester-amid (**14**): 150 mg (0.34 mmol) **9** als TEA-Salz mit 10 ml Methanol/Wasser (9:1) wurden

erschöpfend methyliert durch Zugabe etherischer Diazomethanolösung¹⁶⁾. Der Reaktionsverlauf wurde dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgel (LM: A) verfolgt. Man ließ noch über Nacht rühren, engte i. Vak. ein und nahm mit 20 ml Wasser auf. Es wurde auf pH 8 eingestellt, die Lösung auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 30 × 2.5 cm) gegeben und mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.25 M TEAB-Puffer chromatographiert. Nach Einengen des Hauptpeaks wurde 3 mal mit Methanol abgezogen und aus Wasser lyophilisiert. Ausb. 120 mg **14** (77%). Die chromatographisch einheitliche Substanz reagiert mit dem Periodat-Benzidin-Reagenz negativ (blauer Fleck). Durch Spaltung bei pH 3 erhielt man **1** zurück.

¹H-NMR von **14**: δ = 8.14 und 7.87 (je 1 s, 8-H und 2-H), 5.88 (d, *J* ca. 1 Hz, 1'-H), 4.40 (dd, *J* ca. 5 und 1 Hz, 2'-H), 4.0–3.6 (m, 3', 4', 5'-H), 3.44 (d, *J* = 11 Hz, OCH₃). – UV: λ_{max} = 260 nm. – R_F: 0.38 (F), 0.33 (H). – E: 1.02.

C₁₁H₁₆N₆NaO₆P · H₂O (400.3) Ber. C 33.00 H 4.53 N 21.00 P 7.74
Gef. C 33.37 H 4.58 N 18.69 P 7.66

3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-S-methylthiolphosphorsäure (24): 120 mg (0.26 mmol) **3** als TEA-Salz in 10 ml Methanol/Wasser (9:1) wurden erschöpfend mit etherischer Diazomethanolösung methyliert. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel (LM: A) verfolgt. Nachdem alles Ausgangsprodukt umgesetzt war, wurde zur Trockne eingengt, in 20 ml Wasser gelöst, auf pH 8.5 eingestellt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 30 × 2.5 cm) gegeben. Nach Chromatographie mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.3 M TEAB-Puffer, Einengen des Hauptpeaks, Abziehen mit Methanol und Lyophilisieren aus Wasser erhielt man **24** als farbloses, amorphes TEA-Salz. Ausb. 95 mg **24** (78%).

¹H-NMR: δ = 8.20 und 7.94 (je 1 s, 8-H und 2-H) 5.94 (d, *J* ca. 1.5 Hz, 1'-H), ca. 4.6 (2'-H, teilweise von HOD-Signal verdeckt), 4.3–4.0 (m, 4', 5'-H), 3.71 (t, *J* ca. 6 Hz, 3'-H), 1.90 (d, *J* = 13.8 Hz, SCH₃). – UV: λ_{max} = 259 nm. – R_F: 0.39 (F), 0.32 (H). – E: 1.0.

C₁₁H₁₆N₆NaO₅PS · H₂O (416.4) Ber. C 31.73 H 4.36 N 20.19 P 7.44 S 7.70
Gef. C 31.94 H 4.23 N 18.99 P 7.23 S 7.72

Cycloamid der 3'-Benzylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (17a): 200 mg (0.56 mmol) **15a** in 300 ml wasserfreiem Pyridin wurden mit 88 µl (0.85 mmol) Thiophosphorylchlorid in 10 ml Pyridin versetzt. Man ließ 3 d bei Raumtemp. rühren und arbeitete danach wie bei **9** auf. Nach Chromatographie an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 × 2.5 cm) mit einem Gradienten aus 1.5 l Wasser/1.5 l 0.5 M TEAB-Puffer erhielt man etwa 210 mg (70%) **17a** als chromatographisch einheitliches Produkt. **17a** reagiert mit dem P=S-Reagenz positiv.

¹H-NMR: δ = 7.82 und 7.71 (je 1 s, 8-H und 2-H), 7.3–7.0 (m, C₆H₅), 5.73 (s, 1'-H), 4.5–4.0 (m, 2', 4', 5'-H und CH₂), 3.56 (m, 3'-H). – UV: λ_{max} = 260 nm. – R_F: 0.72 (F), 0.72 (H). – E: 0.74.

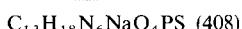
C₁₇H₁₈N₆NaO₄PS (456)

Acidolyse von 17a zu 3'-Benzylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (18a): 120 mg (0.22 mmol) **17a** wurden, in 20 ml Wasser gelöst, auf pH 5 eingestellt. Nach 20 h bei 37°C wurde der Ansatz auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 30 × 2.5 cm) gegeben und mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.4 M TEAB-Puffer chromatographiert. Der Hauptpeak wurde eingengt, der Rückstand mehrmals mit Methanol abgezogen und aus Wasser lyophilisiert. Ausb. 104 mg **18a** (85%) als TEA-Salz.

¹H-NMR: δ = 8.61 und 8.13 (je 1 s, 8-H und 2-H), ca. 7.35 (br „s“, C₆H₅), 6.08 (d, *J* = 3 Hz, 1'-H), 4.49 (dd, *J* = 3 Hz und 5 Hz, 2'-H), 4.4–4.1 (m, 4', 5'-H), 3.85 (s, CH₂), 3.56 (dd, *J* = 5 Hz und 6 Hz, 3'-H). – UV: λ_{max} = 259 nm. – R_F: 0.32 (F), 0.22 (H). – E: 1.83.

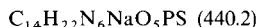
C₁₇H₂₁N₆O₅PS · 4 H₂O (524.5) Ber. C 38.93 H 5.58 N 16.03 P 5.91 S 6.11
Gef. C 39.17 H 4.63 N 14.24 P 6.47 S 5.90

Cycloamid der 3'-Isopropylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (17c): 450 mg (1.46 mmol) **15c** wurden 5 mal in je 20 ml Pyridin gelöst und i. Ölpumpenvak. zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 500 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und langsam mit 165 μ l (1.6 mmol) PSCl_3 in 10 ml Pyridin bei Raumtemp. versetzt. Man ließ 4 d rühren und gab anschließend den Ansatz langsam in 800 ml Eiswasser. Der pH-Wert wurde zwischen 9.5 und 10 gehalten (pH-Stat 0.5 N NaOH). Nach ca. 2 h wurde auf Raumtemp. erwärmt, auf pH 11 eingestellt und am Rotationsverdampfer auf etwa 150 ml eingeengt. Die trübe Lösung wurde filtriert und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3 -Form, 40×5 cm) gegeben. Zunächst wurde mit Wasser nicht umgesetztes Ausgangsprodukt eluiert. Mit einem Gradienten 1.5 l $\text{H}_2\text{O}/1.5$ l 0.33 M TEAB-Puffer, gestoppt bei 0.2 M TEAB, und kontinuierlicher Elution mit 0.25 M TEAB-Puffer wurde das Hauptprodukt isoliert. Der aufsteigende Cl-haltige Teil des Hauptpeaks wurde verworfen und die restlichen chromatographisch einheitlichen Fraktionen eingeengt. Zur Entfernung der restlichen Puffer-substanz wurde nicht wie üblich mehrmals mit Methanol abgezogen, sondern mit Wasser. Nach Überführung in das Na-Salz und Lyophilisieren erhielt man etwa 120 mg **17c** (20%) als farbloses Pulver. Test auf Schwefel positiv. — UV: λ_{max} = 260 nm. — R_F : 0.62 (F), 0.64 (H). — E: 0.9.

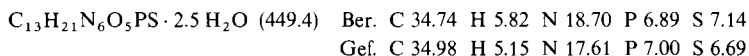


3'-Isopropylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure-monomethylester (17c1): 240 mg (0.78 mmol) **15c** in 500 ml wasserfreiem Pyridin wurden langsam mit 92 μ l (0.9 mmol) Thiophosphorylchlorid in 10 ml Pyridin unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit versetzt. Man ließ 2 d bei Raumtemp. rühren und arbeitete wie für **17a** auf. Nach der üblichen Chromatographie an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3 -Form, 40×2.5 cm) wurde der Hauptpeak rechromatographiert. Nach dem Einengen der Fraktionen wurde mehrmals mit Methanol abgezogen und lyophilisiert. Ausb. 60 mg **17c1** (17.5%) als TEA-Salz.

$^1\text{H-NMR}$: δ = 8.47 und 8.20 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.15 (d, J = 1.5 Hz, 1'-H), ca. 4.8 (teilweise unter HOD-Signal, 2'-H), 4.4–4.2 (m, 4'- und 5'-H), ca. 3.8 (mc, 3'-H), 3.58 (d, J = 12.7, POCH_3), 2.98 (sept, J = 6.3, iPr-Methin-H), 1.14 und 1.11 (je 1 d, J = 6.3, iPr-Methyl-H). — UV: λ_{max} = 260 nm. — R_F : 0.71 (F), 0.73 (H). — E: 0.73.



Als Nebenprodukt wurde *3'-Isopropylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (18c)* als TEA-Salz (ca. 60 mg) isoliert. — $^1\text{H-NMR}$: δ = 8.61 und 8.17 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.14 (d, J = 2.6 Hz, 1'-H), ca. 4.8 (teilweise unter HOD-Signal, 2'-H), 4.5–4.1 (m, 4'- und 5'-H), 3.80 (dd, J = 5.5 und 7.3 Hz, 3'-H), 3.11 (sept, J = 6.3 Hz, iPr-Methin-H), 1.19 und 1.17 (je 1 d, J = 6.3 Hz, iPr-Methyl-H). — UV: λ_{max} = 262 nm. — R_F : 0.23 (F), 0.16 (H). — E: 1.6.

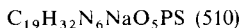


Versuch der Darstellung des Cycloamids der 3'-[(β -Phenylethyl)amino]-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure (17b): 240 mg (0.65 mmol) **15b** wurden 3 mal in wenig Pyridin gelöst und i. Vak. zur Trockne eingeengt. Anschließend löste man in 300 ml Pyridin und gab unter Rühren eine Lösung aus 73.5 μ l (0.72 mmol) Thiophosphorylchlorid in 10 ml Pyridin langsam hinzu. Nach viertägigem Rühren bei Raumtemp. wurde wie für **17c** bei pH 9.5 hydrolysiert und an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3 -Form, 40×2.5 cm) mit einem Gradienten aus 1.5 l $\text{H}_2\text{O}/1.5$ l 0.5 M TEAB-Puffer mit je 35% Methanol chromatographiert. Nach dem Einengen und Überführen in das Na-Salz und Lyophilisieren erhielt man jedoch nur etwa 38 mg eines komplexen Gemisches ($^1\text{H-NMR}$), das aus mindestens vier Verbindungen bestand ($^{31}\text{P-NMR}$).

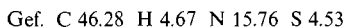
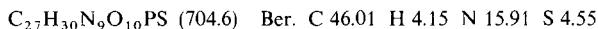
3'-Octylamino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure-monomethylester (17d1): 90 mg (0.24 mmol) **15d** wurden 4 mal mit je 10 ml Pyridin i. Vak. zur Trockne eingeengt. Man löste in 90 ml Pyridin, kühlte auf 0°C ab und gab anschließend 28 μ l (0.27 mmol) Thiophosphorylchlorid

in 5 ml Pyridin hinzu. Nach 3 d bei Raumtemp. wurde der Ansatz wie oben bei pH 9.5 hydrolysiert und an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 25 × 2.5 cm) mit einem Gradienten aus 1 l H₂O/1 l 0.3 M TEAB-Puffer chromatographiert. Nach dem Einengen des Hauptpeaks wurden die Pufferreste durch mehrmaliges Abziehen mit Methanol entfernt. Nach dem Überführen in das Na-Salz und Lyophilisieren erhielt man etwa 5 mg **17d1** (4%).

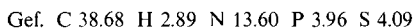
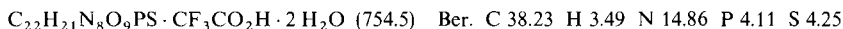
¹H-NMR (CD₃OD): δ = 8.63 und 8.20 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.12 (d, *J* = 3.2 Hz, 1'-H), 4.8–4.1 (m, teilweise von HOD-Signal verdeckt, 2', 3', 4'- und 5'-H), 3.61 (d, *J* = 12.8 Hz, POCH₃), 2.67 (ca. t, *J* ca. 7 Hz, NCH₂), ca. 1.3 (br s, [CH₂]_n), 0.89 (ca. t, *J* ca. 6 Hz, CH₃). – UV: λ_{max} = 260 nm. – R_F: 0.89 (F), 0.88 (H).



3'-(N-BOC-Amino)-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure-bis(p-nitrophenylester) (**19**): 300 mg (0.82 mmol) **2** in ca. 5 ml wasserfreiem Pyridin wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit mit 336 mg (0.9 mmol) Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester) versetzt. Man ließ mehrere Stunden bei Raumtemp. reagieren, engte i. Vak. ein, nahm den Rückstand in Chloroform auf und chromatographierte an einer Kieselgelsäule (30 × 5 cm, Kieselgel 60, 0.063 mm, Merck) mit LM B. Der Hauptpeak lieferte nach Einengen 360 mg **19** (62%) als amorphen festen Rückstand. Schmp. 155–160 °C. UV: λ_{max} = 265 nm. – ¹H-NMR (CDCl₃, stark verbreiterte Signale): δ = 8.18 (s, 8-H und 2-H), 8.13 und 6.34 (je 1 mc, Nitrophenoxy-Protonen), 6.58 (br s, NH), 6.07 (br s, 1'-H), ca. 5.7 (br s, OH), 4.9–4.4 (restliche Ribose-H), 1.45 (s, tBu). – MS (*m/e*): 704 M⁺; 603 M⁺ – CO – O – C(CH₃)₃; 565 M⁺ – *p*-NP; 550 M⁺ – *p*-NP – CH₃, 368 (*p*-NP)₂P=S + CHO, 355 (*p*-NP)₂P=S + O, 339 (*p*-NP)₂P=S, 139 *p*-NP⁺, 135 B⁺. (B = Base; *p*-NP = *p*-Nitrophenol.)

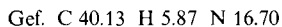
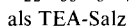
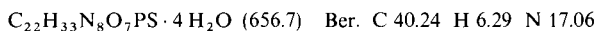


3'-Amino-3'-desoxyadenosin-5'-thionphosphorsäure-bis(p-nitrophenylester) (**20**): 350 mg (0.5 mmol) **19** wurden für 5 min mit 5 ml frisch destillierter Trifluoressigsäure unter Ausschluß von Feuchtigkeit behandelt. Anschließend gab man den Ansatz unter Rühren in 250 ml kalten wasserfreien Ether. Man rührte noch 10 min in der Kälte, saugte den Niederschlag ab und wusch mit Ether. Die Substanz ist chromatographisch einheitlich (Kieselgel, LM A, B, C). Ausb. 280 mg **20** (93%). UV: λ_{max} = 265 nm. – ¹H-NMR (CD₃OD): δ = 8.28 und 8.22 (je 1 s, 8-H und 2-H), ca. 8.2 und ca. 7.3 (je mc, Nitrophenoxy-Protonen), 6.17 (d, *J* = 2.8 Hz, 1'-H), 5.11 (mc) und 4.9–4.65 (m, teilweise unter Lsgm.-Absorption verborgen, 2', 3', 4'- und 5'-H). – R_F: 0.86 (F), 0.75 (H).



Umsetzung von 20 in Methanol/konz. Ammoniak. 210 mg (0.35 mmol) **20** in 30 ml Methanol wurden mit 10 ml konz. Ammoniak versetzt. Nach 4 h bei 40 °C war die Reaktion vollständig. Es wurde eingengt, in wenig Methanol aufgenommen und auf einer PDC-Kieselgelplatte mit LM C chromatographiert. Die nucleotidhaltige Zone wurde abgekratzt, mit Methanol eluiert und eingengt. **21** erhielt man nach Überführung in das Na-Salz und Lyophilisieren als schwach gelbes, amorphes Pulver. Ausb. 145 mg **21** (82%). – UV: λ_{max} = 261 nm.

¹H-NMR (Standard Me₃SiCH₂–CH₂–CO₂Na): δ = 8.11 und 7.06 (AA'BB', weiter aufgespalten durch Diastereomerie und/oder ³¹P-Kopplung), 7.87 und 7.78 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.02 (d, *J* = 1.7 Hz, 1'-H), 4.4–4.2 (m, 4'- und 5'-H; 2'-H wahrscheinlich unter HOD-Signal bei ca. 4.7), 3.8 (m, 3'-H). – R_F: 0.64 (F), 0.52 (H). – E: 0.57.

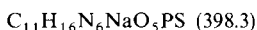


Umsetzung von 1 mit Thionphosphorsäurechlorid-bis(p-nitrophenylester) in DMF und Hünig-Base: 266 mg (1 mmol) **1** wurden in 45 ml wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt)

durch kurzes Erhitzen zum Sieden gelöst. Man kühlte schnell auf Raumtemp. ab, gab 300 μ l (1.75 mmol) Hünig-Base zu und versetzte mit 410 mg (1.1 mmol) Thionphosphorsäurechlorid-bis(*p*-nitrophenylester). Der Reaktionsverlauf wurde dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel, LM C, B und A, verfolgt. Bereits nach weniger als 15 min war die Hauptmenge **1** umgesetzt. Nach etwa 40 h Reaktionszeit bei Raumtemp. wurde i. Ölpumpenvak. auf etwa 5 ml eingengt. Man gab einige Tropfen Triethylamin zu (intensive Gelbfärbung) und chromatographierte den Ansatz auf einer kleinen Kieselgelsäule (7 \times 5 cm, Kieselgel 60, 0.063–0.2 mm, Merck). Die Säule wurde mit Chloroform entwickelt, dann mit LM B und CHCl₃/CH₃OH (8:2). Die Verbindungen mit einer Ladung (**9** und **23**) wurden mit Methanol eluiert. Das Methanoleluat wurde eingengt (\approx 320 mg), in Wasser gelöst, auf pH 8 eingestellt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 \times 2.5 cm) gegeben. Die Elution der Nucleotide erfolgte mit einem Gradienten aus 1 l H₂O/1 l 0.3 M TEAB-Puffer. *N*-(3'-Desoxy-3'-adenosyl)thionphosphorsäure-monomethylesteramid (**23**) wurde zwischen 0.15 und 0.175 M TEAB-Puffer und das 2',3'-cAMP-Analoge **9** zwischen 0.2 und 0.25 M TEAB-Puffer eluiert. Nach dem Einengen der beiden Hauptpeaks wurde 3mal mit Methanol abgezogen und aus Wasser als farbloses, amorphes TEA-Salz lyophilisiert.

23: Test mit Periodat-Benzidin positiv. Auch bei Verbindung **23** versagt somit der Test mit Periodat-Benzidin. Es wird eine intakte vicinale Amino-Hydroxyl-Gruppierung vorgetäuscht. Test auf Schwefel positiv. Ausb. 74 mg **23**, 123 mg **9**.

UV: λ_{\max} = 258 nm. – ¹H-NMR von **23**: δ = 8.28 und 8.08 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.04 (d, *J* = 1.9 Hz, 1'-H), 4.59 (mc) und 4.1–3.9 (m, 2', 3', 4'- und 5'-H), 3.56 (d, *J* = 13 Hz, OCH₃). – *R*_F = 0.45 (F), 0.47 (H). – *E* = 0.9.



Umsetzung von **23** mit Diazomethan. 40 mg (0.1 mmol) Na-Salz **23** in 10 ml CH₃OH/H₂O (9:1) wurden erschöpfend mit etherischer Diazomethanlösung behandelt. Die Reaktion wurde dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel (LM A) verfolgt. Der neu entstehende Fleck reagiert mit dem P=S-Reagenz negativ. Nachdem alles **23** umgesetzt war, wurde zur Trockne eingengt, in Wasser gelöst, auf pH 7.5 eingestellt und an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 20 \times 2.5 cm) mit einem Gradienten aus 1 l H₂O/1 l 0.3 M TEAB-Puffer chromatographiert. Nach Einengen, Lyophilisieren und Überführen in das Na-Salz erhielt man **14** als farbloses amorphes Pulver. Test mit Periodat-Benzidin negativ. Ausb. 29 mg **14** (75%).

Umsetzung von 3'-(*N*-BOC-Amino)-3'-desoxyadenosin (**2**) mit Thiophosphorylchlorid in PTE: 540 mg (1.5 mmol) **2** wurden über Nacht in einer Trockenpistole über P₂O₅ bei 80 °C i. Ölpumpenvak. getrocknet. Nach Überführen in einen 100-ml-Rundkolben wurde in 4 ml wasserfreiem PTE (aufbewahrt über Molekularsieb 4 Å) durch kurzes Erwärmen gelöst. Man kühlte im Eisbad auf 0 °C ab und gab 773 μ l (7.5 mmol) Thiophosphorylchlorid zu. Nach etwa 15 min wurde noch 5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Die Thiophosphorylierung von **2** wurde durch Entnahme von 3 μ l Reaktionslösung und Hydrolyse in 100 μ l 5proz. NaHCO₃-Lösung dünn-schichtchromatographisch (DC, Kieselgel, LM A) verfolgt. Nach der Reaktion wurde bei $<10^{-3}$ Torr bis fast zur Trockne eingengt. Letzteres wurde noch 2mal mit je 2 ml PTE wiederholt. Der ölige Rückstand wurde mit 6 ml frisch destillierter Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und bei Raumtemp. für 12–15 min bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Die TFA wurde innerhalb von 6 min i. Vak. (die letzten 3 min bei $<10^{-3}$ Torr) abgezogen, der Rückstand in 6 ml PTE gelöst und im Eisbad gekühlt.

Hydrolyse. In 1.3 l Eiswasser mit Eisstücken wurde innerhalb von 15–20 min bei pH 10 (pH-Stat, 0.4 N NaOH) die obige Reaktionslösung aus einer Pasteur-Pipette eingetropt. Man rührte noch 1 h bei 0 °C und anschließend 2 h bei Raumtemp. Der Ansatz wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 \times 2.5 cm) gegeben und mit Wasser das 5'-Chlor-Produkt **10** eluiert. Mit einem Gradienten von 1 l H₂O/1 l 0.25 M TEAB-Puffer und 1 l 0.25 M/1 l 0.6 M TEAB-Puffer wurde

das cAMP-Analoge **5** zwischen 0.15 und 0.2 M TEAB und das offene Nucleotid **3** zwischen 0.35 und 0.48 M TEAB-Puffer eluiert. Nach dem Einengen der Peaks wurde **10** nach Dekker³¹⁾ mit Methanol-Wasser-Mischungen an Dowex-OH rechromatographiert. Verbindung **5** wurde nach dem Einengen und Lösen in Methanol auf einer präparativen Kieselgel-Platte (LM A) gereinigt und zur Überführung in das Natriumsalz die wäßrige Lösung über einen Dowex-Na⁺-Austauscher gegeben. Verbindung **3** wurde an einer DEAE-Sephadex-Säule rechromatographiert und in das Na⁺-Salz übergeführt. Ausb. 80 mg **10**, 135 mg **5** (26%), 80 mg **3**.

Trennung von 5 in die Diastereomeren 5a und 5b: Die aus mehreren Ansätzen erhaltene Verbindung **5** wurde an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 50 × 5 cm) mit dem folgenden Gradienten eluiert: 1.5 l H₂O/1.5 l 0.15 M TEAB; 1.5 l 0.15 M TEAB/1.5 l 0.175 M TEAB und kontinuierlich 0.175 M TEAB. Die Peaks der beiden Stereoisomeren wurden eingeeengt, in das Na-Salz übergeführt und lyophilisiert. Die Reinheit der beiden Stereoisomeren wurde an DC-Aluminiumoxid (LM G) kontrolliert.

¹H-NMR von **5a** (δ_{31,P} = 57.5): δ = 8.15 und 8.11 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.06 (s, 1'-H), 4.60 (d, J = 4.9 Hz, 2'-H), 4.53–4.06 (m, 4', 5'-H), 3.83 (ddd, J_{2,3} = 4.9 Hz, J_{3,4} = 9.8 Hz, J_{3,P} = 2.9 Hz, Beweis durch ³¹P-Entkopplung, 3'-H). – UV: λ_{max} = 259 nm. – R_F: 0.36 (F), 0.42 (H), 0.49 (G). – E: 0.87.

¹H-NMR von **5b** (δ_{31,P} = 59.0): δ = 8.20 und 8.14 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.10 (s, 1'-H), 4.61 (d, J = 4.7 Hz, 2'-H), 4.55–4.07 (m, 4', 5'-H), 3.92 (ca. dt, J_{2,3} ≈ J_{3,P} ≈ 4.7 Hz, J_{3,4} = 9.5 Hz, 3'-H). – UV: λ_{max} = 259 nm. – R_F: 0.36 (F), 0.42 (H), 0.61 (G). – E: 0.79.

C₁₀H₁₂N₆NaO₄PS · 2.5 H₂O (411.3) Ber. C 29.20 H 4.14 N 20.43 P 7.53 S 7.80
Gef. C 29.64 H 4.48 N 18.11 P 7.45 S 7.25

Umsetzung von **5** mit Diazomethan

60 mg **5** als TEA-Salz (0.14 mmol) in 10 ml Methanol/H₂O (9:1) wurden bei Raumtemp. innerhalb von 3 h mit insgesamt 4 ml etherischer Diazomethanlösung versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel (LM A) verfolgt. Nach der Reaktion wurde eingeeengt, in H₂O gelöst, auf pH 9 eingestellt und an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 30 × 2.5 cm) mit einem Gradienten aus 1 l H₂O/1 l 0.2 M TEAB-Puffer chromatographiert. Der Hauptpeak wurde bei 0.08–0.1 M TEAB-Puffer eluiert. Man erhielt etwa 45 mg **14** (75%) und etwa 15 mg nicht umgesetztes **5** als TEA-Salz zurück. Nach der Überführung in das Na-Salz wurde **14** durch die ¹H- und ³¹P-Spektren charakterisiert. Bei der sauren Hydrolyse von **14** entstand **1**.

3',5'-Cyclodiamid der 3'-Amino-3',5'-didesoxyadenosin-5'-amidothionphosphorsäure (27): 380 mg (1.36 mmol) 3',5'-Diamino-3',5'-didesoxyadenosin (**25**) wurden in einem 1-l-Rundkolben 3 mal mit je 300 ml wasserfreiem Pyridin in der Siedehitze gelöst und zur Trockne eingeeengt. Anschließend wurde in 600 ml wasserfreiem Pyridin in der Hitze gelöst. Nach dem Abkühlen auf 0°C gab man in etwa 20 min eine Lösung von 154 μl (1.5 mmol) Thiophosphorylchlorid in 10 ml Pyridin zu. Nach etwa 30 min war die Umsetzung beendet. Man kühlte im Kältebad auf etwa –40°C und gab den Ansatz über einen Zeitraum von 90 min in 1 l Eiswasser. Über einen pH-Stat wurde pH 10 eingestellt. Nach der Hydrolyse bei 0°C ließ man auf Raumtemp. kommen, engte auf etwa 350 ml ein und gab den Ansatz auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 × 2.5 cm). Man chromatographierte zunächst mit Wasser und anschließend mit einem Gradienten von 1 l H₂O/1 l 0.25 M TEAB-Puffer. Die Cyclodiamidfraktion wurde zwischen 0.13 und 0.2 M TEAB-Puffer eluiert. Nach dem Einengen, Abziehen mit Methanol und Abfiltrieren eines in Methanol unlöslichen Niederschlags (30 mg) und Lyophilisieren erhielt man 440 mg als TEA-Salz (74%).

³¹⁾ C. A. Dekker, J. Am. Chem. Soc. **87**, 4027 (1965).

Trennung von 27 in die Diastereomeren 27a und 27b: 400 mg der Cyclodiamidfraktion wurden auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 40 × 5 cm) gegeben und mit einem Gradienten von 1.5 l H₂O/1.5 l 0.15 M TEAB-Puffer chromatographiert. Anschließend wurde weiter mit 0.15 M TEAB-Puffer eluiert. Das Elutionsprofil ist dem von **5** sehr ähnlich. Nach dem Einengen der beiden Stereoisomeren-Peaks erhielt man etwa 45 mg von der vermutlichen *exo*- ($\delta_{31P} = 58.9$) und 245 mg ($\delta_{31P} = 53.7$) von der vermutlichen *endo*-Form. Die Reinheit der beiden Stereoisomeren wurde an DC-Aluminiumoxid (LM G) kontrolliert. ¹H-NMR von **27a** ($\delta_{31P} = 53.7$): $\delta = 8.17$ und 8.12 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.03 (br s, 1'-H), 4.58 (d, $J = 4.6$ Hz, 2'-H), 4.2–3.3 (m, 3', 4', 5'-H). – UV: $\lambda_{max} = 258$ nm. – R_F : 0.30 (F), 0.19 (H), 0.40 (G). – E: 0.86.

¹H-NMR von **27b** ($\delta_{31P} = 58.9$): $\delta = 8.22$ und 8.16 (je 1 s, 8-H und 2-H), 6.09 (br s, 1'-H), 4.57 (d, $J = 4.9$ Hz, 2'-H), 4.2–3.2 (m, 3', 4', 5'-H). – UV: $\lambda_{max} = 258$ nm. – R_F : 0.30 (F), 0.19 (H), 0.48 (G). – E: 0.74.

$C_{10}H_{13}N_7NaO_3PS \cdot 2.5 H_2O$ (410.3) Ber. C 29.27 H 4.42 N 23.90 P 7.55 S 7.81
Gef. C 29.34 H 4.46 N 21.93 P 7.22 S 7.30

Umsetzung von 27 mit Diazomethan zum 2-Methylthio-1,3,2λ⁵-diazaphosphorinan-2-on 28³²⁾: 50 mg (0.14 mmol) **27** wurden als Na-Salz in 10 ml Methanol/Wasser (9:1) gelöst und über einen Zeitraum von 5 h mit insgesamt 4 ml etherischer Diazomethanlösung umgesetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel (LM A) verfolgt. Nachdem fast alles **27** umgesetzt war, wurde eingengt, in Wasser aufgenommen, der pH auf 8 eingestellt und an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO₃-Form, 20 × 2.5 cm) chromatographiert. **28** wurde mit Wasser eluiert und lyophilisiert. Ausb. 40 mg (81%).

¹H-NMR (CD₃OD): δ 8.21 (s, 8-H und 2-H), 6.10 (s, 1'-H), 4.8–4.6 und 4.4–3.5 (m, restliche Ribose-Protonen), 2.31 (d, $^3J_{PH} = 15.1$ Hz, SCH₃). UV: $\lambda_{max} = 260$ nm. – MS: M⁺ 357. – R_F : 0.38 (F), 0.44 (H). – E: 0 pH 7.5, 0 pH 10.

$C_{11}H_{16}N_7O_3PS \cdot 0.5 H_2O$ (366.3) Ber. C 36.06 H 4.68 N 26.77 S 8.54
Gef. C 36.18 H 5.07 N 25.47 S 8.92

Spaltung von 28 bei pH 4: 35.7 mg (0.1 mmol) **28** wurden in 20 ml Wasser gelöst und mit 0.5 N HCl auf pH 4 gehalten. Die Spaltung wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LM Methanol/Wasser 9:1) verfolgt. Nach Verschwinden des Ausgangsproduktes entstand ein neuer ninhydrinpositiver Fleck. Es wurde auf ca. 2 ml eingengt und die Lösung auf eine Dowex-OH-Säule (30 × 1.5 cm) gegeben.

Nach Elution mit Wasser und Lyophilisieren des nucleosidhaltigen Peaks erhielt man etwa 21 mg **25** (71%) als farbloses amorphes Pulver. Test mit Periodat-Benzidin: positiv.

$C_{10}H_{15}N_7O_7$ (265.3) Ber. C 45.27 H 5.70 N 36.96 Gef. C 44.57 H 5.73 N 36.70

³²⁾ Weitere Untersuchungen der neu synthetisierten 2-Alkyl- bzw. Alkylthio-1,3,2-diazaphosphorinan-2-one sind im Gange.