

CHEMISCHE BERICHTE

FORTSETZUNG DER
BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON DER
GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

114. JAHRGANG · HEFT 4 · SEITE 1217 – 1580

Synthese von Ara-Tubercidin und seiner 5'-Phosphate über Phasentransfer-Glycosylierung von 4-Amino-2-methylthio- 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

*Frank Seela**, *Quynh-Hoa Tran-Thi* und *Heinz-Dieter Winkler*

Universität Paderborn, Fachbereich Naturwissenschaften II (Organische Chemie),
Warburger Str. 100, D-4790 Paderborn

Eingegangen am 11. August 1980

Phasentransfer-Glycosylierung von 4-Amino-2-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**3a**) mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose führt in 83% Ausbeute zu den anomeren Nucleosid-Derivaten **4a/5a**, die chromatographisch getrennt werden und deren Anomerenverhältnis (β : α) mit 4.9:1 gefunden wird. Raney-Nickel entfernt die Methylthioesterse und nach hydrierender Abspaltung der Benzylschutzgruppen erhält man 4-Amino-7-(β -D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**1a**) und sein α -Anomeres (**6**). Aus dem β -Anomeren **1a** (Ara-Tubercidin) wird mit POCl_3 das 5'-Monophosphat **1b** erhalten, das im Gegensatz zu Ara-AMP (**2b**) von AMP-Desaminase nicht desaminiert wird. **1b** wird durch Kondensation mit Mono[triethylammonium]-orthophosphat bzw. Di[tributylammonium]pyrophosphat und 1,1'-Carbonyldiimidazol in das 5'-Diphosphat **1c** und das 5'-Triphosphat **1d** übergeführt.

Synthesis of Ara Tubercidin and its 5'-Phosphates via Phase Transfer Glycosylation of 4-Amino-2-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine

Phase transfer glycosylation of 4-amino-2-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (**3a**) with 2,3,5-tri-*O*-benzyl-1-bromo-D-arabinofuranose gives the anomeric nucleoside derivatives **4a/5a** in 83% yield. They are separated chromatographically and the ratio of anomers (β : α) is found to be 4.9:1. The methylthio residues are removed with Raney nickel catalyst and the benzyl protecting groups are split off by hydrogenation leading to 4-amino-7-(β -D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (**1a**) and to its α -anomer (**6**). The 5'-monophosphate **1b**, obtained from **1a** by treatment with POCl_3 , cannot be deaminated with AMP deaminase which is in contrast to ara AMP (**2b**). **1b** is converted to the 5'-diphosphate **1c** or the 5'-triphosphate **1d** by condensation with either mono[triethylammonium] orthophosphate or di[tributylammonium] pyrophosphate and 1,1'-carbonyldiimidazole.

Chem. Ber. **114**, 1217 – 1225 (1981)

© Verlag Chemie, GmbH, D-6940 Weinheim, 1981

0009 – 2940/81/0404 – 1217 \$ 02.50/0

4-Amino-7-(β -D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (Ara-Tubercidin) (**1a**)¹⁾ besitzt wie Ara-A (**2a**)²⁾ antivirale Eigenschaften. Es wird jedoch im Gegensatz zu diesem durch das Enzym Adenosin-Desaminase nicht desaminiert¹⁾. Biologisch aktive Formen der Arabinonucleoside sind deren 5'-Phosphate, speziell das 5'-Mono-, -di- und -triphosphat^{3,4)}.

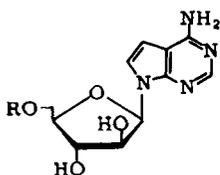
Die Darstellung von **1a** wurde von uns bisher über die Phasentransfer-Glycosylierung von 4-Chlor-2-methylthio-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**3b**)¹⁾ oder 4-Amino-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**3c**)⁵⁾ mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose⁶⁾ vorgenommen. Bei der *N*-7-Glycosylierung der 4-Chlorverbindung **3b** überwiegt bei 85proz. Gesamtausbeute der β - gegenüber dem α -Anomerenanteil mit 4.7:1¹⁾. Die *N*-7-Glycosylierung der 4-Aminoverbindung **3c** führt bei 57proz. Gesamtausbeute zu etwa gleichen Anteilen an anomeren *N*-7-Glycosylierungsprodukten (β : α , 1.3:1)⁵⁾.

Die Unterschiede in den Ausbeuten und den Anomerenverhältnissen bei der Phasentransfer-Glycosylierung von **3b** und **3c** führen wir auf unterschiedliche Anionenkonzentration der Aglycone in der organischen Phase zurück. Der aglyconische Anionenanteil kann sowohl durch die Art des Phasentransfer-Katalysators⁷⁾, durch die Acidität des Pyrrolprotons, aber auch durch Löslichkeitseigenschaften des Aglycons bzw. seines Anions in der organischen Phase bestimmt werden. Rasche Umsetzungen und hohe Ausbeuten werden bei den Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Aglyconen beobachtet, die einen 2-Methylthioest besitzen. Fehlt dieser Rest, wie bei **3c**, dann sinkt die Löslichkeit des Aglycons in der organischen Phase ab und die Gesamtausbeute geht zurück. Da die Ausbeute nicht durch eine Verlängerung der Reaktionszeit zu erhöhen ist, muß im wesentlichen der Zerfall der 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose die *N*-Glycosylierung limitieren.

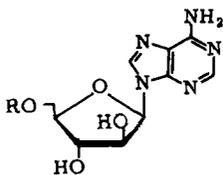
Den günstigen Umsetzungseigenschaften von **3b** bezüglich Ausbeute und Anomerenverteilung steht jedoch entgegen, daß die anomeren *N*-7-Glycosylierungsprodukte in einem weiteren Reaktionsschritt in ethanolischem Ammoniak unter Druck zu den 4-Aminoverbindungen **4a** bzw. **5a** umgesetzt werden müssen. Wir haben deshalb 4-Amino-2-methylthio-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**3a**)¹⁾ in die Phasentransfer-Glycosylierung eingesetzt, denn es hatte sich bei dem Aglycon ohne 2-Methylthioest, **3c**, gezeigt, daß unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen keine Reaktion an der 4-Aminogruppe erfolgt⁵⁾.

Setzt man das Aglycon **3a** mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose unter den Bedingungen der Phasentransfer-Glycosylierung⁸⁾ um, so erhält man in 83proz. Gesamtausbeute ein Anomerenmisch. Die Auftrennung der Anomeren erfolgt an Kieselgel auf einer Mitteldrucksäule. Aus der schneller wandernden Zone erhält man in 69proz. Ausbeute das β -Anomere **4a**, aus der langsamer wandernden in 14proz. Ausbeute das α -Anomere **5a**. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Anomeren verhalten sich hier umgekehrt, wie die der entsprechenden 4-Chlor- bzw. 4-Methoxyverbindungen¹⁾. Die Zuordnung erfolgt über die ¹H-NMR-Spektroskopie. Wird das 1'-H-Signal in CDCl₃ des α -Anomeren **5a** bei $\delta = 6.46$ gefunden, so liegt das des β -Anomeren **4a** bei 6.77. Da **4a** bereits auf anderem Wege dargestellt worden war¹⁾ und mit der hier gewonnenen Verbindung identisch ist, ist die Zuordnung eindeutig.

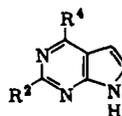
Das Anomerenverhältnis β : α beträgt bei der Phasentransfer-Glycosylierung des Aglycons **3a** 4.9:1 und ist dem von 4-Chlor-2-methylthio-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**3b**) sehr ähnlich¹⁾. Bei der Glycosylierung von **3c** hingegen bildeten sich die Anomeren im Verhältnis 1.3:1⁵⁾. Diese Verschiebung geht mit einer Absenkung der Gesamtausbeute auf 57% einher. Der Abfall der Ausbeute geht also im wesentlichen auf Kosten des β -Anomeren. Damit erhöht sich relativ der α -Anteil im Anomerenmisch.



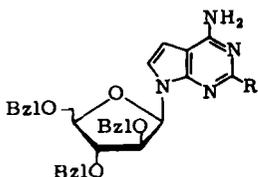
	R
1a	H
b	PO ₃ H ₂ ^{a)}
c	P ₂ O ₆ H ₃ ^{a)}
d	P ₃ O ₉ H ₄ ^{a)}



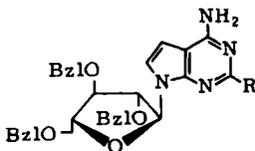
	R
2a	H
b	PO ₃ H ₂



	R ²	R ⁴
3a	SCH ₃	NH ₂
b	SCH ₃	Cl
c	H	NH ₂

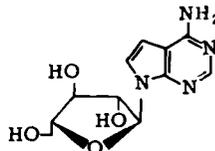


	R
4a	SCH ₃
b	H



	R
5a	SCH ₃
b	H

Bzl = C₆H₅CH₂



6

^{a)}Als Triethylammoniumsalz

Bei **5a** läßt sich der 2-Methylthioest, wie schon für **4a** beschrieben¹⁾, mit Raney-Nickel in 2-Propanol/Benzol entfernen, wobei auffällig ist, daß die Abspaltung des 2-Methylthioestes bei den anomeren Nucleosid-Derivaten **4a** und **5a** deutlich leichter erfolgt als bei ihrem Aglycon **3a**. Hier ist die Abspaltung des Methylthioestes entscheidend von der Katalysatoraktivität und dem Verhältnis Aglycon/Raney-Nickel abhängig.

Katalytische Hydrierung von **4b**¹⁾ bzw. **5b** führt zu den anomeren Nucleosiden **1a** und **6**; während β-Ara-Tubercidin (**1a**) aus Methanol nur mikrokristallin anfällt, kristallisiert sein α-Anomeres (**6**) aus Wasser in farblosen Nadeln.

Eignet sich für die Trennung der geschützten Nucleosid-Derivate **4a** und **5a** besonders die Mitteldruckchromatographie an Lobar-Fertigsäulen, so erfolgt die Trennung der anomeren Nucleoside **1a** und **6** im präparativen Maßstab am besten an Dowex-Ionenaustauschersäulen in Wasser/Methanol (3:2)⁹⁾. Die Auftrennung analytischer Mengen ist besonders günstig bei der reversed phase-Chromatographie. Hier erfolgt die Auftrennung von **1a** und **6** an LiChrosorb RP 18 in 0.01 M wäßrigem KH₂PO₄/Methanol (94:6), pH 5.1.

Die anomeren Nucleoside **1a** und **6** zeichnen sich durch eine extrem schwache Elliptizität im CD-Spektrum aus, die bei **1a** im Vergleich zu **2a** (beide bei 260 nm) nur etwa 10% der Intensität erreicht (Abb. 1). Hierfür kann sowohl die veränderte Polarisierbarkeit des Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-Chromophors gegenüber dem Purin-Chromophor als

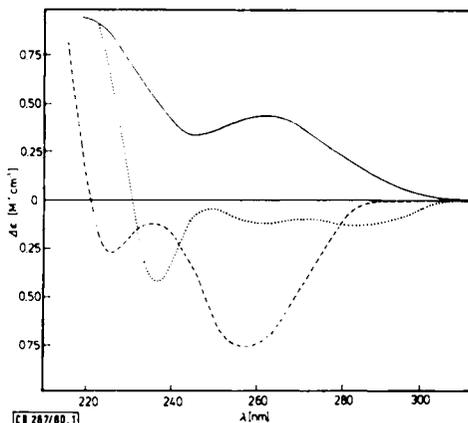


Abb. 1. CD-Spektren von β -Ara-Tubercidin (**1a**) [\cdots], α -Ara-Tubercidin (**6**) [—] und β -Ara-A (**2a**) [---] in Wasser

auch eine relativ unbehinderte Rotation um die Glycosidbindung verantwortlich sein. Für eine starke konformative Beweglichkeit der Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Nucleoside sprechen $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen an Tubercidin-5'-monophosphat¹⁰⁾. Überraschend ist die starke Beweglichkeit gegenüber den konformer fixierten Purin-Derivaten, die auch Grund für die antibiotische Wirkung von 7-Desaza-Nucleosiden sein mag. Tubercidin wird so z. B. gegenüber Adenosin bevorzugt durch Polynucleotid-Phosphorylase in Ribonucleinsäuren eingebaut, und diese synthetischen messenger RNAs werden wiederum beschleunigt am Ribosom abgelesen und in Protein übersetzt¹¹⁾.

Aus Ara-Tubercidin (**1a**) läßt sich ohne Schutz der *trans*-diolischen Hydroxylgruppen nach Yoshikawa¹²⁾ das 5'-Monophosphat **1b** in über 76proz. Ausbeute gewinnen. Es kann am Anionenaustauscher vom Ausgangsprodukt befreit und mit einem linearen Gradienten von $[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{NH}]\text{HCO}_3$ (TBK) bei 0.3 M TBK eluiert werden. In der Dünnschichtelektrophorese wandert es im Sauren wie Ara-AMP und TuMP, in Na-Tetraborat unterscheiden sich jedoch die Ara- von den Ribo-Verbindungen deutlich (Tab.), denn sie bilden keine Komplexe mit Borat-Anionen. Im $^{31}\text{P-NMR}$ weist **1b** ein Singulett bei $\delta = -2.79$ (D_2O) bzw. -3.94 ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, pH 12) auf.

Ara-Tubercidin-5'-monophosphat (**1b**) stellt eine interessante Verbindung im Hinblick auf die antiviralen Eigenschaften von Arabinofuranosyl-Nucleosiden, sowie deren Verhalten gegenüber deaktivierenden Enzymen dar. Adenosin-Desaminase bewirkt nämlich bei Ara-A (**2a**) dessen weitgehende Inaktivierung als Virostatikum durch Umwandlung in Ara-H¹³⁾. Ara-Tubercidin (**1a**) hingegen ist, wie wir unlängst fanden¹⁾, gegenüber dem Enzym absolut stabil. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, daß für die Bindung von Adenosin-Derivaten an das aktive Zentrum von Adenosin-Desaminase der Purinstickstoff N-7 von entscheidender Bedeutung ist. Im Gegensatz zu Ara-A (**2a**) wird nun sein 5'-Monophosphat **2b** durch Adenosin-Desaminase ebenfalls nicht desaminiert, da für die Desaminierung von AMP-Derivaten ein spezielles Enzym, die AMP-Desaminase¹⁴⁾, benötigt wird. So der Stickstoff in Position 7 des Purinrings essentiell für die Bindung von Adenosin-Derivaten an das aktive Zentrum von Des-

aminasen ist, sollte auch Ara-TuMP (**1b**) nicht durch AMP-Desaminase desaminiert werden. Abb. 2 zeigt, daß Ara-TuMP (**1b**) im Gegensatz zu Ara-AMP (**2b**) keine Desaminierung durch AMP-Desaminase erfährt. Damit ist sichergestellt, daß bei beiden Desaminasen trotz unterschiedlicher Substraterfordernisse das Purin-N-7 essentiell für eine Bindung des Substrats an das aktive Zentrum des Enzyms ist. Eine derartige Bindung könnte über eine Wasserstoffbrücke vom Enzym zum freien Elektronenpaar an N-7 erfolgen. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit Befunden an Tubercidin-5'-monophosphat, dessen Stabilität gegenüber AMP-Desaminase beschrieben wurde¹⁵⁾. Dem entgegenstehende Angaben¹⁶⁾, in denen die Desaminierung von TuMP durch AMP-Desaminase beschrieben wird, konnten von uns nicht bestätigt werden. Wie Ara-TuMP (**1b**) wurde auch TuMP durch AMP-Desaminase nicht desaminiert.

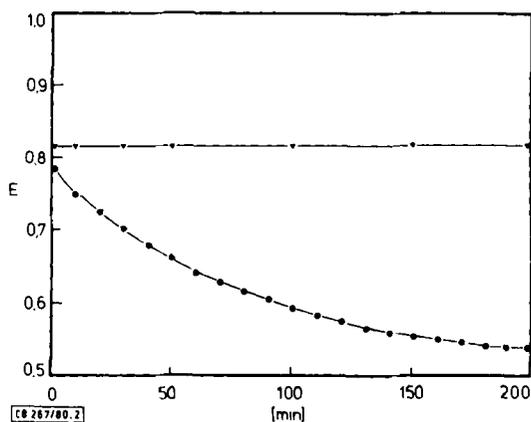


Abb. 2. Extinktionsänderung bei der enzymatischen Desaminierung von β -Ara-AMP (**2b**) [● - ●] bei 260 nm und β -Ara-TuMP (**1b**) [▼ - ▼] bei 270 nm in 1/15 M Sörensen-Puffer, pH 7.0, in Gegenwart von 0.03 enzymatischen Einheiten AMP-Desaminase/ml

Aufgrund der starken Inhibitorwirkung von 9-(β -D-Arabinofuranosyl)adenin-5'-diphosphat gegenüber dem Enzym Ribonucleotid-Reduktase¹⁷⁾ und der terminierenden Funktion von (β -D-Arabinofuranosyl)adenin-5'-triphosphat bei der Biosynthese von Nucleinsäuren⁴⁾ haben wir Ara-Tubercidin-5'-diphosphat (**1c**) und dessen Triphosphat **1d** synthetisch dargestellt. Nach Umsalzen am Ionenaustauscher wurde aus dem Monophosphat **1b** dessen Pyridiniumsalz gewonnen und in DMF in das Trioctylammoniumsalz übergeführt. Durch Kondensation mit Mono(trioctylammonium)orthophosphat mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol erhält man das Diphosphat **1c**. Nach Chromatographie am Anionenaustauscher fällt es als Triethylammoniumsalz analytisch rein an. In der Dünnschichtelektrophorese (Tab.) besitzt es mehr als die doppelte Wanderungsgeschwindigkeit des Monophosphats **1b**. Im ³¹P-NMR (D₂O) zeigt es zwei Dubletts bei $\delta = 8.43$ und 10.74 mit einer Kopplungskonstante von 21 Hz, womit gezeigt ist, daß eine Pyrophosphatstruktur vorliegt.

Analog dem 5'-Diphosphat **1c** kann auch das Triphosphat **1d** aus dem Tributylammoniumsalz des Monophosphats **1b** dargestellt werden, indem man es mit Di[tri-

butylammonium]pyrophosphat nach Hoard und Ott¹⁸⁾ kondensiert. Die Auftrennung des Reaktionsansatzes erfolgt wie bei 1c am Anionenaustauscher; 1d wird mit 0.45 M TBK eluiert.

Tab.: Chromatographische (R_F) und elektrophoretische (R_E) Mobilitäten von Tubercidin- und Adenosin-Derivaten

	Kieselgel R_E (0.1 M Na-Citrat) pH 6.5	Cellulose R_E (0.1 M Na-Tetraborat) pH 9.0	PEI-Cellulose R_F (1 M LiCl)
Tubercidin	1.0 (-)	0.6 (+)	-
Adenosin	1.0 (-)	0.6 (+)	-
Ara-Tubercidin (1a)	1.0 (-)	1.0 (-)	-
Ara-A (2a)	1.0 (-)	1.0 (-)	-
TuMP	1.1 (+)	2.4 (+)	0.4
AMP	1.8 (+)	3.4 (+)	0.6
Ara-AMP (2b)	2.0 (+)	1.5 (+)	0.6
Ara-TuMP (1b)	1.0 (+)	1.6 (+)	0.5
Ara-TuDP (1c)	2.8 (+)	-	0.2
Ara-TuTP (1d)	-	-	0.13

R_E -Werte relativ zu Ara-Tubercidin (1a); (+) zur Anode, (-) zu Kathode.

Die Mono-, Di- und Triphosphate von 1a unterscheiden sich in ihren Mobilitäten in der Dünnschichtelektrophorese bei pH 6.5 und auch in der Chromatographie auf PEI-Cellulose (Tab.). Nur geringe Mobilitätsunterschiede beobachtet man jedoch zwischen den β -D-Arabinofuranosyl- und den β -D-Ribofuranosyl-Verbindungen (Tab.). Führt man die Trennungen jedoch in Na-Tetraborat bei pH 9.0 durch, dann wandern die Ribofuranosyl-Verbindungen aufgrund der Komplexbildung des Borat-Anions mit dem *cis*-Diol des D-Ribofuranosyl-Restes stärker zur Anode.

Bei der Synthese von 1c und auch von 1d fällt auf, daß die Ausbeuten bei der Phosphatkondensation deutlich unter denen der entsprechenden D-Ribofuranosyl-Verbindungen liegen. Dieses Phänomen ist, wie die chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte zeigt, nicht auf unumgesetztes Ausgangsmaterial zurückzuführen. Wir vermuten, daß aufgrund der günstigen Stellung der 2'-Hydroxylgruppe zum 5'-Phosphatrest die β -D-Arabinofuranosyl-Verbindungen besonders leicht zur Bildung von Cyclophosphaten neigen, die dann die Ausbeuten an 5'-Di- bzw. -Triphosphat absenken.

Herrn J. Ott danken wir für die enzymatischen Tests, Herrn B. Seeger für die Aufnahme der ³¹P- und ¹³C-NMR-Spektren und Herrn W. Bußmann für die Messung der CD-Spektren. Die Arbeit wurde mit Mitteln des Landes Nordrhein-Westfalen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und einer Beihilfe des Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Berl-Block (Wagner und Munz, München); die Werte sind nicht korrigiert. – Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller, Göttingen. – ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren: Bruker HX-60 und Varian EM 390-Spektrometer, δ -Werte relativ zu Tetramethylsilan (interner Standard) bzw. H₃PO₄ (externer Standard). – UV-Spektren: Zeiss PMQ 3- oder Shimadzu UV-200-Spektrometer. – CD-Spektren: Mark IV UV-Vis Auto-Dichrograph (Instruments S.A., Frankreich).

Chromatographie: Die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) und die Dünnschicht-elektrophorese (DE) wurden an Kieselgel F 254-Platten (Woelm, Eschwege), Cellulose-Platten G 1440/LS 254 (Schleicher & Schüll) und PEI Cellulose-Platten Polygram CEL 300 PEI/UV₂₅₄ (Macherey, Nagel & Co.) durchgeführt. Die präparative Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel 60 (230–400 mesh ASTM, Merck, Darmstadt), Cellulose-Anionenaustauscher (DE 52, Whatman, Maidstone) oder Dowex 50-WX-4 Ionenaustauscher (Serva, Heidelberg). Bei der präparativen Mitteldruckchromatographie wurden Lobar-Fertigsäulen B und C (LiChroprep Si 60, Merck, Darmstadt) und eine Duramat-Druckpumpe (CfG, Heidelberg) verwendet. Die Dünnschichtelektrophorese wurde in einer TLE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg) bei 5 °C durchgeführt. Bei der präparativen Chromatographie waren die Säulen mit einem Uvicord II und einem UltraRac Fraktionensammler (LKB-Instruments, Schweden) verbunden.

Laufmittel für die DC bzw. DE: A (Chloroform/Methanol, 97.5:2.5), B (Chloroform/Methanol, 99:1), C (Chloroform/Methanol, 95:5), D (0.1 M Natrium-citrat, pH 6.5), E (0.1 M Natrium-tetraborat, pH 9.0). 1 M [(C₂H₅)₃NH]HCO₃ (TBK) wurde durch Einleiten von Kohlendioxid in eine Mischung von 8528 ml Wasser und 1472 ml Triethylamin bis zum Erreichen von pH 7.5 hergestellt.

Kondensation von 4-Amino-2-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (3a) mit 2,3,5-Tri-O-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose: In 3.40 g (6.0 mmol) 2,3,5-Tri-O-benzyl-1-O-(4-nitrobenzoyl)-D-arabinofuranose⁶⁾ in 15 ml Dichlormethan wird so lange trockener Bromwasserstoff eingeleitet, bis keine 4-Nitrobenzoesäure mehr ausfällt. Die Säure wird abgesaugt und mit kaltem Dichlormethan gewaschen. Beim Eindampfen der vereinigten Filtrate erhält man gelbliche, viskose 2,3,5-Tri-O-benzyl-1-brom-D-arabinofuranose. 1.0 g (5.54 mmol) 3a werden in 15 ml Dichlormethan und 5 ml 1,2-Dimethoxyethan suspendiert. Man versetzt mit 0.3 g (1.1 mmol) Benzyltriethylammonium-chlorid und ca. 15 ml 50proz. wäßrigem Natriumhydroxid und rührt ca. 1 min mit dem Vibromischer. Die Halogenose in ca. 5 ml Dichlormethan wird langsam unter Rühren (Vibromischer) in die Emulsion getropft und das Durchmischen der Phasen 15 min fortgesetzt. Man trennt die organische Phase ab, schüttelt mit Wasser, trocknet über Na₂SO₄, filtriert und dampft das Lösungsmittel i. Vak. ab. Der ölige Rückstand wird in 20 ml Chloroform aufgenommen und an einer Kieselgelsäule (Lobar-Fertigsäule C, Laufmittel A) mehrfach chromatographiert. Aus der schneller wandernden Zone erhält man 2.22 g (69%) 4a¹⁾, aus der langsamer wandernden Zone 0.45 g (14%) 5a.

4-Amino-2-methylthio-7-(2,3,5-tri-O-benzyl-α-D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (5a): Farblose, viskose Substanz. DC (Kieselgel, A): R_F = 0.40. – UV (Methanol): λ_{max} = 234, 281 nm (ε = 22300, 13000). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.50 (s, SCH₃), 3.83 (d, 5'-H, J = 4.5 Hz), 4.10–4.75 (m, 2', 3', 4'-H), 4.58 (s, 3 Benzyl-CH₂), 5.42 (s, breit, NH₂), 6.28 (d, 5-H, J = 4.0 Hz), 6.46 (d, 1'-H, J = 3.5 Hz), 7.08 (d, 6-H, J = 4.0 Hz), 7.20–7.45 (m, 15 aromat. H). – ¹³C-NMR ([D₆]DMSO): δ = 13.28 (SCH₃), 69.94 (C-5'), 71.30, 72.40 (3 Benzyl-CH₂), 81.86 (C-3'), 82.56 (C-4'), 85.93 (C-2'), 87.42 (C-1'), 100.18 (C-5, C-4a), 120.78 (C-6), 127.64–128.22 (15 aromat. C), 137.35, 137.80, 138.20 (3 aromat. C), 150.50 (C-7a), 157.17 (C-4), 163.39 (C-2).

C₃₃H₃₄N₄O₄S (583.0) Ber. C 67.99 H 5.88 N 9.65 S 5.50

Gef. C 67.41 H 5.77 N 9.39 S 5.50

4-Amino-2-methylthio-7-(2,3,5-tri-O-benzyl-β-D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (4a): Farblose, viskose Substanz¹⁾. DC (Kieselgel, A): R_F = 0.45.

4-Amino-7-(2,3,5-tri-O-benzyl-α-D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (5b): 0.70 g (1.20 mmol) 5a werden in 80 ml 2-Propanol/Benzol (1:1) mit 5 g Raney-Nickel-Suspension versetzt und unter starkem Rühren 12 h unter Rückfluß gekocht. Man filtriert das Raney-Nickel ab, wäscht mit ca. 100 ml 2-Propanol und dampft die vereinigten Filtrate ein. Der Rückstand wird an

Kieselgel (Lobar-Fertigsäule, B) chromatographiert. Ausb. 0.50 g (78.1%) schwachgelbes sirupöses **5b**. DC(Kieselgel, C): $R_F = 0.35^*)$. – UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 269$ nm ($\epsilon = 11600$). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 3.63$ (d, 5'-H, $J = 5.0$ Hz), 4.10–4.70 (m, 2', 3', 4'-H), 4.53 (s, 3 Benzyl- CH_2), 5.55 (s, breit, NH_2), 6.33 (d, 5-H, $J = 3.5$ Hz), 6.55 (d, 1'-H, $J = 3.0$ Hz), 7.10–7.45 (m, 6-H, 15 arom. H), 8.33 (s, 2-H). – $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 69.80$ (C-5'), 71.23, 72.33 (3 Benzyl- CH_2), 81.72 (C-3'), 82.50 (C-4'), 86.00 (C-2'), 86.84 (C-1'), 100.18 (C-5), 102.70 (C-4a), 121.61 (C-6), 127.57, 128.15 (15 arom. C), 138.13, 137.74, 127.35 (3 arom. C), 149.92 (C-7a), 151.92 (C-2), 157.56 (C-4).

$\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ (536.6) Ber. C 71.62 H 6.01 N 10.44 Gef. C 71.74 H 6.00 N 10.27

4-Amino-7-(α -D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**6**): 150 mg (0.28 mmol) **5b** in 25 ml Methanol werden unter Normaldruck 24 h mit Pd/Aktivkohle (10% Pd) bei Raumtemp. hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand (58 mg, 78%) aus Wasser umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Schmp. 233–235 °C. DC (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2): $R_F = 0.22$; β -Anomeres **1a**¹⁾ $R_F = 0.18$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ (266.3) Ber. C 49.62 H 5.30 N 21.04 Gef. C 49.75 H 5.37 N 21.11

Ara-Tubercidin-5'-monophosphat, Triethylammoniumsalz (**1b**): 60 mg (0.225 mmol) **1a** in 1 ml Trimethylphosphat werden bei 0 °C mit 41 μl (0.45 mmol) POCl_3 versetzt. Man hält 5 h zwischen 0–4 °C, hydrolysiert mit Eis und stellt mit 1 M TBK auf pH 6 ein. Die mit Wasser auf 80 ml verdünnte Substanz wird an einer 45 \times 3.5-cm-Anionenaustauschersäule (DE 52 Cellulose, Whatman, Maidstone) adsorbiert. Elution mit 1500 ml 0.5 M TBK/1500 ml Wasser trennt das Hauptprodukt zwischen 0.25 und 0.35 M TBK ab; nach Abdampfen und mehrmaligem Nachdampfen mit Wasser/Ethanol erhält man 2050 A_{271} -Einheiten (76%, bezogen auf $\epsilon_{271} = 11900$) farbloses glasiges **1b**^{**}). UV (Wasser): $\lambda_{\max} = 271$ nm. – $^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O): $\delta = -2.79$; ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, pH 12): $\delta = -3.94$.

Ara-Tubercidin-5'-diphosphat, Triethylammoniumsalz (**1c**): 2130 A_{271} -Einheiten (0.179 mmol) **1b** in 75 ml Wasser werden an einer 16 \times 1.5-cm-Kationenaustauschersäule (Dowex 50-WX-4, Pyridiniumform) umgesalzt, das mit Wasser eluierte Pyridiniumsalz abgedampft, mit 78 μl (0.179 mmol) Trioctylamin versetzt und mehrmals mit wasserfreiem Pyridin und Dimethylformamid (DMF) nachgedampft. Der glasige Rückstand wird in 2 ml DMF gelöst und unter Rühren mit einer Lösung von 160 mg (1 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 2 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wird unter Feuchtigkeitsausschluss 24 h bei Raumtemp. aufbewahrt und zur Lösung 50 μl Methanol gegeben. Nach 30 min wird mit 5 ml DMF, das 98 mg (1 mmol) Orthophosphorsäure und 430 μl (1 mmol) Trioctylamin enthält, versetzt und 2 d bei Raumtemp. gerührt. Der Reaktionsansatz wird i. Hochvak. eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und an einer 45 \times 3.5-cm-Anionenaustauschersäule (DE 52 Cellulose) adsorbiert. Elution mit 1500 ml 0.6 M TBK/1500 ml Wasser führt um 0.4 M TBK zur Abtrennung von **1c**. Nach Abdampfen erhält man 740 A_{271} -Einheiten (35%) farbloses glasiges **1c**. – UV (Wasser): $\lambda_{\max} = 271$ nm. – $^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O): $\delta = 8.43$ (d, $J = 21$ Hz), 10.74 (d, $J = 21$ Hz); ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, pH 13): $\delta = 5.70$ (d, $J = 22$ Hz), 10.24 (d, $J = 22$ Hz).

Ara-Tubercidin-5'-triphosphat, Triethylammoniumsalz (**1d**): 1190 A_{271} -Einheiten (0.1 mmol) **1b** in 20 ml Wasser werden an einer 16 \times 1.5-cm-Kationenaustauschersäule (Dowex 50-WX-4, Pyridiniumform) umgesalzt, das mit Wasser eluierte Pyridiniumsalz abgedampft, mit 24 μl (0.1 mmol) Tributylamin versetzt und mehrmals mit wasserfreiem Pyridin, dann mit DMF nachgedampft. Der glasige Rückstand wird in 2 ml DMF gelöst und unter Rühren mit einer Lösung

^{*)} Mobilität wie β -Anomeres **4b**.

^{***)} Bei Elution mit 0.5 M $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1.5 l) erhält man zwischen 0.25–0.35 M das amorphe Ammoniumsalz.

von 80 mg (0.5 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 1 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wird unter Feuchtigkeitsschluß 24 h bei Raumtemp. aufbewahrt; zur Lösung werden 35 μ l Methanol gegeben, nach 30 min wird mit 2 ml DMF, das 0.5 mmol Di[tributylammonium]pyrophosphat⁹⁾ enthält, versetzt und 2 d bei Raumtemp. gerührt. Der Reaktionsansatz wird i. Hochvak. eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und an einer 45 \times 3.5-cm-Anionenaustauschersäule (DE 52 Cellulose) adsorbiert. Elution mit 1500 ml 0.6 M TBK/1500 ml Wasser führt um 0.45 M TBK zur Abtrennung des Triphosphats 1d. Nach Abdampfen erhält man 357 A₂₇₁-Einheiten (30%) farbloses glasiges 1d. – UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 271$ nm. – ¹³P-NMR (D₂O): $\delta = 10.28$ (d, γ P, $J = 26$ Hz), 11.06 (d, α P, $J = 26$ Hz), 22.80 (t, β P, $J = 26$ Hz).

⁹⁾ 223 mg (0.5 mmol) Tetranatrium-diphosphat \cdot 10 H₂O werden in wenig Wasser gelöst, auf einer 16 \times 1.5-cm-Kationenaustauschersäule (Dowex 50-WX-4, Pyridiniumform) gegeben und mit 1 l 20proz. wäßriger Pyridinlösung eluiert. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand mit 238 μ l (1 mmol) Tributylamin versetzt, mehrmals mit wasserfreiem Pyridin und DMF nachgedampft und in 2 ml DMF gelöst.

- 1) H.-D. Winkeler und F. Seela, Chem. Ber. **113**, 2069 (1980).
- 2) W. W. Lee, A. Benitez, L. Goodman und B. R. Baker, J. Am. Chem. Soc. **82**, 2648 (1960).
- 3) J. J. Furth und S. S. Cohen, Cancer Res. **27**, 1528 (1967).
- 4) S. S. Cohen in Nucleoside Analogues (R. T. Walker, E. DeClerq und F. Eckstein, Hrsg.), S. 225, Plenum Press, New York 1979.
- 5) F. Seela und H.-D. Winkeler, Angew. Chem. **93**, 105 (1981); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **20**, 97 (1981).
- 6) R. Barker und H. G. Fletcher jr., J. Org. Chem. **26**, 4605 (1961).
- 7) F. Seela und H.-D. Winkeler, Angew. Chem. **91**, 570 (1979).
- 8) F. Seela und D. Hasselmann, Chem. Ber. **113**, 3389 (1980).
- 9) C. A. Dekker, J. Am. Chem. Soc. **87**, 4027 (1965).
- 10) F. E. Evans und R. H. Sarma, Cancer Res. **35**, 1458 (1975).
- 11) F. Seela, Q.-H. Tran-Thi, H. Mentzel und V. A. Erdmann, Biochemistry (1981, im Druck).
- 12) M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Lett. **1967**, 5065; Bull. Chem. Soc. Jpn. **42**, 3505 (1969).
- 13) G. A. LePage, J. Biochem. **48**, 75 (1970).
- 14) C. L. Zielke und C. H. Suelter, in The Enzymes, 3. Aufl., Bd. 4, S. 64 (P. D. Boyer, Hrsg.), Academic Press, New York 1971.
- 15) C. L. Zielke und C. H. Suelter, J. Biol. Chem. **246**, 1313 (1971).
- 16) A. Bloch, E. Mihich, R. J. Leonard und C. A. Nichol, Cancer Res. **29**, 110 (1969).
- 17) E. C. Moore und S. S. Cohen, J. Biol. Chem. **242**, 2116 (1968).
- 18) D. E. Hoard und D. G. Ott, J. Am. Chem. Soc. **87**, 1785 (1965).

[267/80]