

160. Nucleoside und Nucleotide. Teil 11.
Phosphorylierung von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon und
dessen Verhalten bei der Synthese von Dinucleotiden¹⁾²⁾

von Felix Waldmeier und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität,
 St. Johannisring 19, CH-4056 Basel

(22. III. 78)

Nucleosides and Nucleotides, Part 11.
Phosphorylation of 1-(2'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon and
its Behaviour in the Synthesis of Dinucleotides

Summary

The behaviour of the unnatural nucleoside 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (Π_d , **1**) in the synthesis of dinucleotides with purine deoxy-nucleotides was studied. The optimized preparation of the protected dinucleoside phosphates (MeOTr) Π_d pG_d^{ib} (**5**) and (MeOTr) Π_d pA_d^{bz} (**7**) using the diester method of *Khorana* with DCC as condensing agent is described. The removal of the *N*-acyl- and *p*-methoxytrityl groups was effected by successive treatment with conc. ammonia solution and acetic acid/water 1:1 at 23° yielding the free dinucleoside phosphates Π_d pG_d (**9**) and Π_d pA_d (**11**). In a similar way, starting from (CNEt)p Π_d (**15**), the dinucleotides p Π_d pG_d^{ib} (**16**), p Π_d pG_d (**18**), p Π_d pA_d^{bz} (**17**) and p Π_d pA_d (**19**) were synthesized.

The nucleotide 1-(5'-*O*-Phosphoryl-2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (p Π_d , **3**) was prepared in excellent yield by selective phosphorylation of Π_d (**1**) using phosphorylchloride in triethyl phosphate at -40°. Deoxyadenosine was phosphorylated in the same way.

The compounds were characterized by UV. spectroscopy, chromatography and enzymatic degradation.

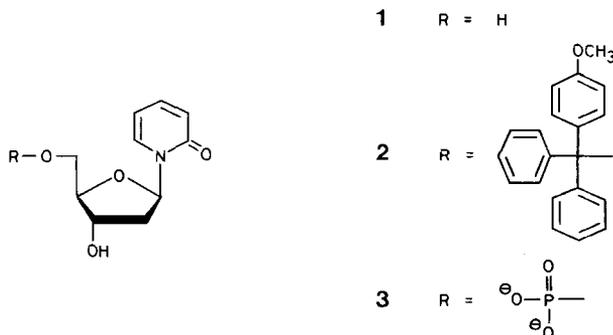
1. Einleitung. - Im Hinblick auf die Synthese von Polynucleotiden mit dem unnatürlichen Nucleosid 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (Π_d , **1**)³⁾ für enzymatische Versuche nach einem von uns entwickelten Konzept [5] war die genaue Abklärung der Reaktivität von Π_d notwendig. In diesem Zusammenhang hatten wir die Verknüpfbarkeit von Π_d mit den Pyrimidinnucleotiden pT_d und pC_d unter den üblichen Bedingungen der Oligonucleotidsynthese nach der Diester-

1) Teil 10 s. [1].

2) Für Details s. [2].

3) Zu den Abkürzungen vgl. [3] [4].

Methode weitgehend abgeklärt. So wurden ausgehend von 1-(5'-*O*-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon ((MeOTr) Π_d , **2**) die geschützten Dinucleosidphosphate (MeOTr) Π_d pT_d [6] und (MeOTr) Π_d pC_d^{an} [7] synthetisiert und durch Abspaltung der Schutzgruppen die freien Dinucleosidphosphate Π_d pT_d und Π_d pC_d gewonnen. Im weiteren wurden ausgehend von 1-(5'-*O*-Phosphoryl-3'-*O*-acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (p Π_d (Ac), 3'-*O*-Acetyl-3) die Trinucleosidphosphate (MeOTr)T_dpT_dp Π_d und T_dpT_dp Π_d hergestellt [1].



Diese erfolgreich verlaufenen Synthesen haben gezeigt, dass unter den Bedingungen der wichtigsten bisher durchgeführten Reaktionen die labile glykosidische Bindung in Π_d nicht angegriffen wird. Damit liegen die im Hinblick auf eine Polynucleotidsynthese benötigten Erfahrungen mit Pyrimidinnucleotiden vor. Hingegen war noch unbekannt, unter welchen Bedingungen sich Π_d mit Purinnucleotiden verknüpfen lässt. Die beiden natürlichen Purinnucleotide pA_d und pG_d besitzen eine Aminogruppe, die bei der Polynucleotidsynthese zu schützen ist. Ausserdem ist bekannt, dass Purinnucleotide speziell gegenüber Säure weniger stabil sind als die Pyrimidinnucleotide [8] [9]. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Verknüpfbarkeit von Π_d mit Purinnucleotiden unter Berücksichtigung des breiten Spektrums der bei einer Kettensynthese vorkommenden Reaktionen (Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen, Kondensationen). Wir synthetisierten zu diesem Zweck die Dinucleosidphosphate Π_d pG_d (**9**) und Π_d pA_d (**11**) sowie die Dinucleotide p Π_d pG_d (**18**) und p Π_d pA_d (**19**) und jeweils die mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Derivate dieser Verbindungen.

Das für die Synthese der Dinucleotide benötigte Nucleotid 1-(5'-*O*-Phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (p Π_d , **3**) wurde durch ein rationelleres Verfahren als bisher [1] [3] hergestellt.

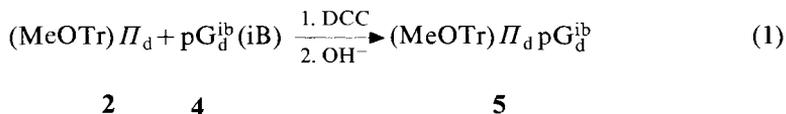
Beide Verbindungstypen, Dinucleosidmonophosphate wie 5'-Dinucleotide, sind Syntheseprodukte bei der Polynucleotidsynthese nach der Diester-Methode von *Khorana* et al. [10-12]. Dabei wird die 5'-Phosphomonoestergruppe eines Nucleotids oder Oligonucleotids mit der 3'-Hydroxygruppe eines anderen Nucleosids bzw. Oligonucleotids (Blocksynthese) kondensiert, wobei als Kondensationsmittel Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) oder Mesitylsulfonylchlorid (MS) in Frage kommen [10].

In neuerer Zeit hat sich die Polynucleotidsynthese nach der Triester-Methode stark entwickelt, wobei verschiedene Varianten zu beachtlichen Erfolgen führten

[13]. Mit Rücksicht auf Π_d verfahren wir dennoch wie bisher nach der Diester-Methode, die zwar nicht in jeder Hinsicht optimal, jedoch schonend ist und sich auf eine grosse Erfahrung abstützen kann.

2. Synthese von (MeOTr) Π_d pG_d^{ib} (5). – Als Schutzgruppen bei der Kondensation verwendeten wir für die 5'-Hydroxygruppe von Π_d den bewährten Monomethoxytrityl-Rest [10] und für die Amino- und 3'-Hydroxygruppe von pG_d den ebenfalls bewährten Isobutyryl-Rest [13]. (MeOTr) Π_d (2) wurde nach [6] und pG_d^{ib} (4) in Anlehnung an die von *Khorana & Büchi* beschriebene Methode hergestellt [14]. Als Kondensationsmittel verwendeten wir DCC, da TPS bei Π_d partielle Basenabspaltung bewirkt [6].

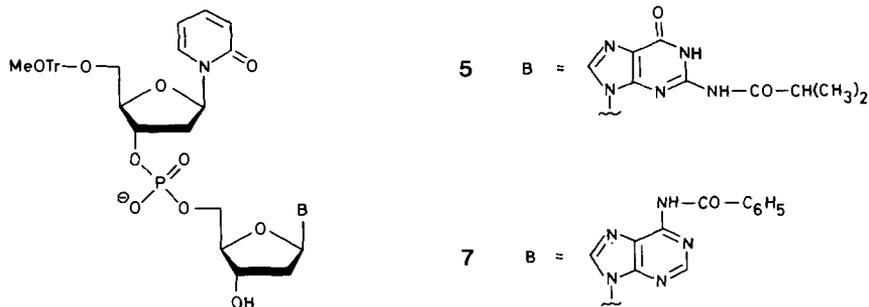
Zur Synthese von (MeOTr) Π_d pG_d^{ib} (5) wurden das Nucleosid 2 und das Nucleotid 4 (vgl. Gl. (1)) in absolutem Pyridin drei bis sieben Tage bei Raumtemperatur mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuss an DCC behandelt.



Da von 2 grössere Mengen zur Verfügung standen als von 4, arbeiteten wir anfänglich mit einem Überschuss von 2. Bessere Resultate wurden jedoch mit überschüssigem 4, entsprechend Literaturangaben [10] erhalten. Beim üblichen Vorgehen zum Trocknen der Reaktanden, nämlich mehrmaligem Eindampfen mit absolutem Pyridin im Hochvakuum [15], wurde eine zunehmende Braunfärbung der Substanzen beobachtet. Wir vermuten deshalb, dass dieses Vorgehen für einige Nucleotide schädlich ist, und trockneten 2 und 4 ohne Pyridin im Hochvakuum. Aus einer neueren Studie über den Wirkungsmechanismus von DCC kann zudem geschlossen werden, dass sich Feuchtigkeit nicht so stark wie bisher angenommen auswirkt [16]. Unter Einhaltung optimaler Bedingungen (s. exper. Teil) wurde weder Farbentwicklung noch Bildung von Nebenprodukten beobachtet.

Zur Hydrolyse des überschüssigen Kondensationsmittels wurde das Reaktionsgemisch zuerst mit Pyridin verdünnt und dann mit Wasser 18 Stunden gerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wurde darauf am besten durch Abfiltrieren und Extraktion mit Äther/Pentan 4:1 aus einer 10proz. wässrigen Pyridinlösung entfernt, da sich dabei keine Emulsionen bildeten. Hierauf wurde durch alkalische Hydrolyse unter den üblichen Bedingungen [15] die 3'-Isobutyrylgruppe selektiv entfernt. Zur weiteren Reinigung und Isolierung von 5 erwies sich Extraktion mit 2-Butanol aus wässriger Phase als ungünstig, obwohl dieses Verfahren sich in einem ähnlichen Falle bewährt hatte [6]. Die Resultate waren nicht reproduzierbar, und 5 enthielt verschiedene Verunreinigungen. Besser verlief die Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Methanol/Chloroform 1:1. Dieses Vorgehen war auch bei der Reinigung von (MeOTr) Π_d pC_d^{an} erfolgreich [7]. Da dieses Verfahren aber mit Substanzverlusten verbunden war, versuchten wir die Reinigung von 5 auch mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher. Beim Arbeiten mit einem Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat verzögerte sich die Eluierung von 5 jedoch wegen der Affinität der lipophilen Schutzgruppen zum *Sephadex*-Trägermaterial, so dass keine Trennung von Nucleotid pG_d^{ib} zustande kam. Sehr gut verlief die Trennung jedoch, wenn mit einem Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. wässrigem Äthanol eluiert wurde. Diese Arbeitsweise hatte sich schon in anderen ähnlichen Fällen als erfolgreich erwiesen [7] [17] [18]. Das dabei erhaltene dünnschicht-

chromatographisch reine Produkt **5** wurde zuerst, wie in der Literatur beschrieben, durch Fällen aus Äther [15], später aber schonender durch Lyophilisieren aus einer wässrigen Lösung isoliert, die Pyridin und Äthanol enthielt.

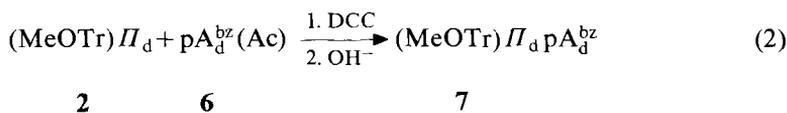


Die zuerst erreichten Ausbeuten an **5** von 36–45% beim Arbeiten nach Literaturangaben liessen sich durch Einhalten der beschriebenen optimalen Bedingungen auf 83% steigern.

Das UV.-Spektrum von **5** zeigte Absorptionsmaxima bei 282 nm (auf der längerwelligen Seite flach abfallend), 258–262 und 228 nm, was einer Überlagerung der Spektren der Edukte **2** und **4** entspricht. Die weitere Charakterisierung erfolgte durch Entfernung der Schutzgruppen und enzymatische Spaltung (siehe unten).

3. Synthese von (MeOTr) Π_d pA $_d^{bz}$ (7**). –** Zur Synthese von (MeOTr) Π_d pA $_d^{bz}$ (**7**) verwenden wir für Desoxyadenosin die bewährten Schutzgruppen Benzoyl an der Aminogruppe und Acetyl an der 3'-Hydroxygruppe [10]. Das zur Synthese benötigte pA $_d^{bz}$ (Ac) (**6**) wurde in Anlehnung an das von *Ralph & Khorana* beschriebene Verfahren hergestellt [19].

(MeOTr) Π_d (**2**) und pA $_d^{bz}$ (Ac) (**6**) wurden im Verhältnis 1,2:1 als trockene Pulver mit DCC in Pyridin umgesetzt (vgl. Gl. (2) und Kap. 2).



Nach sieben Tagen zeigte das braune Gemisch im Dünnschichtchromatogramm nur geringe Nebenproduktbildung.

Die Aufarbeitung und die alkalische Hydrolyse der 3'-O-Acetylgruppe wurde wie in Kap. 2 beschrieben vorgenommen. Das rohe **7** wurde darauf an *DEAE-Sephadex* mit einem zweistufigen Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat chromatographiert [18]. Im ersten Gradienten mit 15% Methanol wurde das symmetrische Pyrophosphat A $_d^{bz}$ -5'-pp-5'-A $_d^{bz}$ eluiert, im zweiten mit 50% Äthanol das gewünschte Produkt **7** und das Mononucleotid pA $_d^{bz}$. Durch Fällen aus Äther erhielten wir das reine (MeOTr) Π_d pA $_d^{bz}$.

Das UV.-Spektrum von **7**, das in einer Ausbeute von 68% erhalten wurde, zeigte ein Maximum bei 281 nm (auf der längerwelligen Seite flach abfallend) und eine

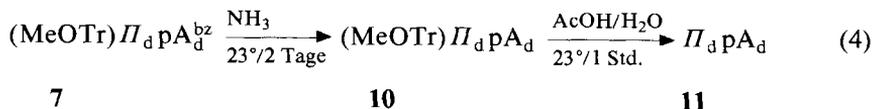
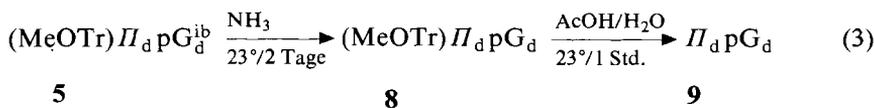
Schulter bei 229 nm, was einer Überlagerung der Spektren von **2** und **6** entspricht. Die weitere Charakterisierung erfolgte wiederum durch Entfernung der Schutzgruppen und enzymatische Spaltung (siehe unten).

4. Entfernung der Schutzgruppen bei Dinucleosidphosphaten. - Zur vollständigen und schonenden Entfernung der Monomethoxytrityl-Gruppe aus **5** und **7** wurden verschiedene Enttritylierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit geprüft.

Gregor *et al.* hatten festgestellt, dass die Methode mit 80proz. wässriger Essigsäure bei 100°, die zur Enttritylierung von Thymidinderivaten verwendet worden war [9], aber bei Desoxypurinnucleotiden Basenabspaltung bewirkt, auch bei Π_d quantitativ zum Bruch der glykosidischen Bindung führt [6]. Ebenso hatten andere Beobachtungen, wie die basenabspaltende Wirkung von TPS [6] oder von Chlorphosphorsäure-bis(2,2,2-trichloräthylester) [3] auf die Säurelabilität von Π_d hingewiesen. Aus diesem Grunde wurde zur Enttritylierung von Verbindungen, die Π_d , T_d und C_d enthielten, die mildere Methode mit Essigsäure/Pyridin 7:3 bei 100° angewandt [1] [6]. Wir versuchten darum auch (MeOTr) Π_d pG $_d^{ib}$ (**5**), nach Behandlung mit Ammoniak, auf diese Weise zu enttritylieren. Dabei wurden aber aus dem gewünschten Produkt Π_d pG $_d$ (**9**) ca. 50% Guanin abgespalten. Weitere Versuche mit anderen Enttritylierungsreagentien bei 100° zeigten, dass sich zwar Bedingungen finden lassen, unter denen Π_d stabil ist, dass aber dabei bei G $_d$ immer beträchtliche Basenabspaltung eintritt. Dies war der Fall bei Behandlung mit Essigsäure/Methanol 1:9 während 30 Minuten, mit Essigsäure/Äthanol/Wasser 1:4:15 während 40 Minuten und mit 1proz. Salzsäure in Methanol während 3 Minuten bei 100°. Dagegen liessen sich bei Raumtemperatur Π_d - wie G $_d$ -Derivate in wässriger Essigsäure [20] bei nicht zu langer Reaktionsdauer schonend enttritylieren. So war Basenabspaltung mit 80proz. Essigsäure erst nach ca. 4 Stunden, mit 50proz. erst nach ca. 15 Stunden bei G $_d$ feststellbar. Π_d ist in wässriger Essigsäure bei Raumtemperatur stabil. Die Enttritylierung benötigte jeweils ca. 20 bzw. 60 Minuten.

Die Versuche erlauben eine Aussage über die Stabilität der glykosidischen Bindung von Π_d gegenüber Säure. Sowohl bei 100° wie bei 23° erwies sich Π_d als etwas stabiler als G $_d$, woraus sich die Stabilitätsreihe: Desoxypyrimidinnucleoside > Π_d > Desoxypurinnucleoside ergibt.

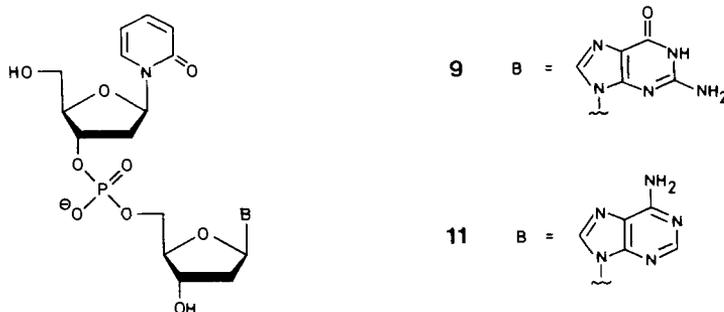
Die Entfernung der Schutzgruppen bei den Verbindungen **5** und **7** wurde schliesslich wie folgt durchgeführt (vgl. Gl. (3) und (4)): Mit konz. Ammoniak wurde die *N*-Isobutyryl- bzw. die *N*-Benzoylgruppe, dann mit wässriger Essigsäure bei 23° die Monomethoxytritylgruppe abgespalten. Die Reaktionen liessen sich im Dünnschichtchromatogramm verfolgen, wobei die auftretenden Zwischenprodukte **8** und **10** nicht isoliert wurden. Die Enttritylierung erfolgte nach der Ammonolyse, da die glykosidische Bindung in *N*-acylierten Nucleotiden unter sauren Bedingungen labiler ist als in den ungeschützten. Dies gilt besonders für die Desoxypurinnucleotide [9] [21].



Pyridin musste nach der Ammonolyse sorgfältig entfernt werden, da es die Enttritylierung verzögern kann. Die Enttritylierung wurde durch Eindampfen im Hochvakuum beendet. Die so erhaltenen

Dinucleosidphosphate **9** und **11** wurden an *DEAE-Sephadex* mit einem Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat chromatographiert und lyophilisiert.

Die reinen Verbindungen **9** und **11** wurden in Ausbeuten von 95 bzw. 85% (ohne Berücksichtigung der Hypochromie) erhalten. In ihren UV.-Spektren waren die Maxima von Π_d und G_d bzw. A_d leicht zu erkennen: **9** zeigte Maxima bei 231 und 254 nm und Schultern bei 270–275 und 301 nm, **11** Maxima bei 262 und 301,5 nm und eine Schulter bei 227 nm. Die Spektren von **9** und **11** waren ausserdem identisch mit denen von $p\Pi_d pG_d$ (**18**) bzw. $p\Pi_d pA_d$ (**19**). Die weitere Charakterisierung erfolgte durch enzymatische Spaltung (siehe unten).



5. Phosphorylierung von Π_d (1**) zu $p\Pi_d$ (**3**).** – Für die Synthese von Dinucleotiden wie $p\Pi_d pG_d$ (**18**) und $p\Pi_d pA_d$ (**19**) (vgl. Kap. 7) wurde $p\Pi_d$ (**3**), das 5'-Phosphat von Π_d benötigt. $p\Pi_d$ war bisher auf zwei nicht ganz befriedigenden Wegen hergestellt worden.

Π_d wurde früher von uns mit Chlorphosphorsäure-bis(2,2,2-trichloräthylester) nach *Eckstein et al.* [22] selektiv in 5'-Stellung phosphoryliert [3]. Nach reduktiver Entfernung der Schutzgruppen wurde $p\Pi_d$ in einer Ausbeute von 18%, nach Verbesserung des Verfahrens von 33% erhalten. Das Verfahren von *Eckstein* war das erste gewesen, das die selektive 5'-Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside erlaubte. Im Falle von Π_d erwiesen sich jedoch die Bedingungen als zu wenig mild.

Wir stellten deshalb $p\Pi_d$ auch auf dem klassischen, aufwendigen Wege nach *Tener* [23] her. Dabei wurde das 3'-O-Acetylderivat von Π_d durch aufeinanderfolgende 5'-Tritylierung, 3'-Acetylierung und 5'-Entritylierung des Nucleosids hergestellt und mit Phosphorsäure-2-cyanoäthylester in Anwesenheit von DCC in nur 22% Gesamtausbeute zu $p\Pi_d$ umgesetzt [1].

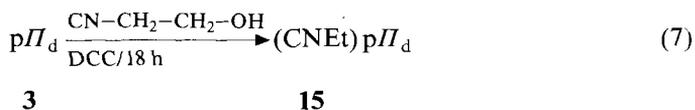
Da $p\Pi_d$ eine Schlüsselverbindung darstellt, war es deshalb notwendig, eine leistungsfähigere Synthese zu suchen.

In den letzten Jahren ist das Interesse an modifizierten Nucleotiden und an Phosphorylierungsmethoden gestiegen, da nicht nur Nucleosidanaloga, sondern – wie sich neuerdings zeigte – auch Nucleotidanaloga interessante biologische Eigenschaften besitzen [24]. In diesem Zusammenhang wurde eine grosse Zahl von Nucleosiden phosphoryliert und eine Vielfalt von Methoden geprüft [11] [25]. Bisher am erfolgreichsten war das Verfahren von *Yoshikawa* [26], das die selektive 5'-Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside mit Phosphorylchlorid in Phosphorsäuretriäthylester bei 0° erlaubt. Die Reaktion ist schonend und läuft in einem einzigen Schritt ab. Die damit erzielten Ausbeuten waren bei Ribonucleosiden sehr hoch, bei Desoxyribonucleosiden und Purinnucleosiden jedoch unter dem Durchschnitt. Auch Nucleosidanaloga liessen sich auf diese Weise phosphorylieren [25] [27]. Nicht phosphorylierbar waren aber Desoxyadenosin und Desoxyguanosin [26].



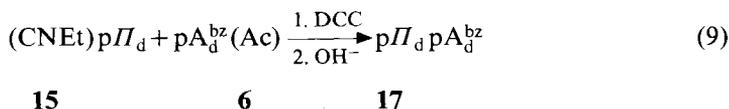
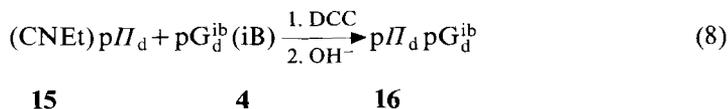
Die beschriebene Methode dürfte sich auch zur Phosphorylierung anderer labiler Nucleoside eignen.

7. Synthese von $\text{pII}_d\text{pG}_d^{\text{ib}}$ (16) und $\text{pII}_d\text{pA}_d^{\text{bz}}$ (17). - Zur Synthese der Dinucleotide **16** und **17** wurde das Nucleotid pII_d (**3**) an der Phosphatgruppe durch den β -Cynaoäthylrest geschützt, der zwar in verschiedener Hinsicht nicht optimal ist, mit dem jedoch grosse Erfahrung gesammelt worden ist [10-12] [15]. Zudem ist seine Abspaltung unproblematisch. Er wurde bei pII_d (**3**), wie von *Weber & Khorana* [15] beschrieben, eingeführt (vgl. Gl. (7) und exper. Teil). Das als hygroskopischer Schaum isolierte, dünnschichtchromatographisch reine **15** wurde in 86-88% Ausbeute erhalten.



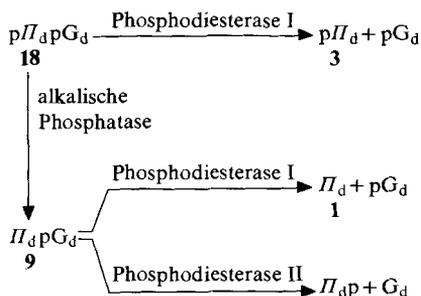
Das UV.-Spektrum von **15** war identisch mit dem von pII_d (**3**). Die Anwesenheit der β -Cynaoäthylgruppe war aus den chromatographischen Daten wie aus dem 90-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in DMSO ersichtlich. Die α -Methylenprotonen erschienen als doppeltes Triplet bei 3,74 ppm, die β -Methylenprotonen als Triplet bei 2,71 ppm. Behandlung von **15** mit 1N NaOH bei 0° während 20 Minuten ergab pII_d .

Die Kondensation von $(\text{CNEt})\text{pII}_d$ mit pG_d^{ib} (iB) bzw. pA_d^{bz} (Ac) wurde, wie in den Kap. 2 und 3 beschrieben, durchgeführt (Gl. (8) und (9) und exper. Teil). Nach Hydrolyse in Wasser/Pyridin und Aufarbeitung wurde durch alkalische Hydrolyse die 3'-O-Isobutyrylgruppe bzw. die 3'-O-Acetylgruppe entfernt. Die Produkte **16** und **17** liessen sich durch Chromatographie an *DEAE*-Sephadex von mehreren Nebenprodukten rein abtrennen und durch Lyophilisieren aus Wasser als farblose Flocken in 54 bzw. 34% Ausbeute isolieren. Zwar konnten die nicht umgesetzten Edukte teilweise zurückgewonnen werden, ein grosser Teil war aber während der Reaktion zerstört worden oder bei der Aufarbeitung verloren gegangen.

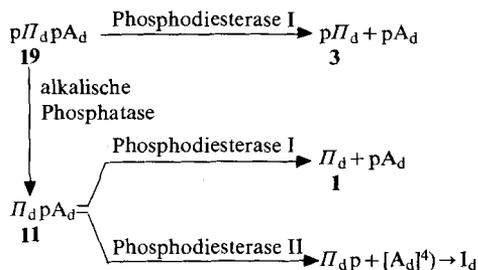


Die Verbindungen wurden UV.-spektroskopisch, chromatographisch (s. Tab. 2, exper. Teil) und enzymatisch charakterisiert. Die enzymatischen Versuche wurden nach Literaturangaben durchgeführt [1] [29]. So wurden die Dinucleotide **18** und **19** mit alkalischer Phosphatase in die Dinucleosidphosphate **9** bzw. **11** übergeführt und durch Phosphodiesterase I zu Mononucleotiden gespalten. Die Dinucleosidphosphate wurden sowohl durch Phosphodiesterase I wie Phosphodiesterase II gespalten (Schema 1 und 2). Die Spaltprodukte wurden jeweils im erwarteten Verhältnis von 1:1 gefunden (vgl. Tab. 1, exper. Teil).

Schema 1



Schema 2



Die Ergebnisse der beschriebenen Arbeiten zeigen, dass Π_{d} nach der Diester-Methode leicht mit Purinnucleotiden verknüpft werden kann und dass alle Reaktionen der Oligonucleotidsynthese mit Π_{d} durchführbar sind. Damit sollte es möglich sein, eine Oligonucleotidkette, die Π_{d} enthält, ohne Schwierigkeiten zu synthetisieren.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 2.0550.73, 2.294.74 und 2.435.0.75) für die gewährte Unterstützung.

⁴⁾ A_{d} wurde zu Desoxyinosin abgebaut [30].

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* S. [1]. Zusätzlich dazu oder abweichend davon: Die UV.-Spektren wurden mit einem Beckman-UV.-Spektrometer, Modell 25, aufgenommen; Angabe von λ_{\max} in nm (ϵ). - Fließmittelsysteme für die DC. (v/v): A) 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2; B) Äthanol/1M Ammoniumacetat pH 7,5, 7:3; C) 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 5:2:3; D) Chloroform/Methanol 1:1; E) 1-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 6:1:3. - Für die Ionenaustauscherchromatographie wurden die Säulen in der Hydrogencarbonatform vorbereitet. Die Fraktionengröße betrug 23-26 ml bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,53-1,67 ml/Min. - Zusatz von 1-Butanol zu wässrigen Lösungen verhinderte Schaumbildung und Spritzen beim Eindampfen i.RV. - Bei den Phosphorylierungen wurde Phosphorsäure-triäthylester *pract. Fluka*, Buchs, über Molekularsieb 4Å getrocknet, verwendet. Phosphorylchlorid (*suprapur.*) wurde bei *E. Merck AG.*, Darmstadt, bezogen. - Fr. = Fraktion.

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (II_d , **1**) wurde nach [3] hergestellt. Kristallisation aus Methylchlorid/Petroläther ergab farblose glänzende Plättchen vom Smp. 118-120° ([3]: 116-117,5°).

1-(5'-O-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ((MeOTr) II_d , **2**) wurde wie früher beschrieben hergestellt [6]. - UV. (Äthanol): 302 (6650), 229 (20500), 284 Sch. (5020), 275 Sch. (3980); $\epsilon_{280} = 4920$ (vgl. [6]).

N²-Isobutyryl-3'-O-isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5'-phosphat (pG_d^{ib}(iB), **4**) wurde nach [14] [18] hergestellt. Lyophilisiertes pG_d-Pyridiniumsalz wurde mit 60 Äquiv. Isobuttersäureanhydrid und Pyridin 8 Tage umgesetzt. Nach Methanolyse der klaren Lösung (24 Std.) und Hydrolyse (1 Std.) wurde i.HV. eingedampft und aus Äther gefällt. - UV. (Äthanol): 257 (17765), 280 (11590); $\epsilon_{280}/\epsilon_{260} = 0,68$ (vgl. [14] [31]).

N⁶-Benzoyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyadenosin-5'-phosphat wurde nach [19] hergestellt. - UV. (Äthanol): 281 (20725), 244 min. (10350); $\epsilon_{280} = 20620$ (vgl. [19]).

2. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin ((MeOTr) II_d pG_d^{ib}, **5**). Eine Lösung von 45,5 mg (0,094 mmol; 463 OD₂₈₀-Einheiten⁵⁾) (MeOTr) II_d (**2**), 80 mg (0,141 mmol; 1637 OD₂₈₀) pG_d^{ib}(iB) (**4**) und 194 mg (0,94 mmol, 6,7 Äquiv. bzgl. **4**) DCC in 2 ml frisch destilliertem abs. Pyridin⁶⁾ wurde bei 23° im Dunkeln gerührt. Aus der klaren hellgelben Lösung begann sich nach 10 Min. Dicyclohexylharnstoff abzuscheiden. Die Farbe der Lösung blieb während der ganzen Reaktion unverändert⁶⁾. Nach 7 Tagen wurde mit 8 ml Pyridin verdünnt, mit 8 ml Wasser hydrolysiert und die Suspension weitere 18 Std. gerührt. Dann wurde über Watte vom mikrokristallinen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Niederschlag mit 15 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Nach Eindampfen des Filtrats fiel wieder Harnstoff aus. Das Gemisch wurde in Pyridin gelöst, mit Wasser auf 150 ml einer 10proz. Pyridinlösung verdünnt, 2mal mit 150 ml Äther/Pentan 4:1 extrahiert und die organischen Phasen je 3mal mit 150 ml 10proz. wässrigem Pyridin zurückgewaschen. Die Trennung der klaren Phasen erfolgte jeweils sofort. Das DC. zeigte vollständige Abtrennung von nicht umgesetztem (MeOTr) II_d und restlichem Dicyclohexylharnstoff. Nach Eindampfen der wässrigen Phase wurde der Rückstand in 30 ml 50proz. Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt und mit 30 ml auf 0° gekühlter 2N NaOH versetzt. Zur Herstellung einer homogenen Lösung wurden 5 ml Äthanol zugegeben. Nach 20 Min. Hydrolyse bei 0° wurde mit 100 ml kaltem Pyridinium-Dowex-50 neutralisiert, nach 15 Min. über eine Säule von Dowex abfiltriert und die Säule zuerst mit 100 ml 25proz. Pyridin, dann mit 100 ml 25proz. Äthanol gewaschen (Durchflussgeschwindigkeit 1,5 ml/Min.). Kontrolle im UV. zeigte, dass alles Material eluiert worden war. Das DC. (Systeme A, B) zeigte neben **5** nur das nicht umgesetzte Mononucleotid pG_d^{ib}. Das Eluat wurde eingedampft und als Lösung in 20 ml 50proz. Äthanol auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 × 1 cm) gebracht. Es wurde mit einem Gradienten von 6 l 0-0,1M NH₄HCO₃ in 50proz. Äthanol eluiert. Die Fr. 44-56 (0,018-0,023M NH₄HCO₃) enthielten 1290 OD₂₈₀-Einheiten (83%) von **5** und die Fr. 136-160 (0,057-0,067M NH₄HCO₃) 495 OD₂₈₀ von pG_d^{ib} (30% des eingesetzten **4**). Nach Eindampfen i.V. wurde **5** aus 30 ml Wasser/Pyridin/Äthanol 7:2:1 lyophilisiert und als farblose, DC.-einheitliche (A, B) Flecken isoliert (81 mg). - UV. (Äthanol): 282, 258-262, 229; $\epsilon_{282}/\epsilon_{229} = 0,72$, $\epsilon_{282}/\epsilon_{262} = 0,93$, $\epsilon_{300}/\epsilon_{262} = 0,66$.

5) 1 OD-Einheit ist die Menge Substanz, die in 1-ml-Lösung in einer 1-cm-Zelle eine Absorption von 1,0 ergibt.

6) Beim Verwenden von nicht frisch destilliertem Pyridin färbte sich das Gemisch dunkel.

3. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2-(1H)-pyridon-(3'-5')-N⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin ((MeOTr) Π_d pA β^z (7), 322 mg (327 OD₂₈₀; 0,066 mmol) (MeOTr) Π_d (2), 30,9 mg (1143 OD₂₈₀; 0,056 mmol) pA β^z (Ac) (6) und 95 mg (8,2 Äquiv.) DCC wurden in 1,6 ml destilliertem abs. Pyridin gerührt. Die braune Suspension wurde nach 8 Tagen hydrolysiert, wobei das DC. neben 2 und einer Spur 6 vor allem das gewünschte 7 zeigte. Die Aufarbeitung wurde im wesentlichen wie in Kap. 2 beschrieben vorgenommen. Das so erhaltene rohe 7 wurde als Lösung in 50proz. Äthanol auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht, die in 2 Stufen eluiert wurde: 1) Gradient von 3 l 0-0,1M NH₄HCO₃ in 15proz. Methanol; 2) Gradient von 3 l 0-0,1M NH₄HCO₃ in 50proz. Äthanol. Die Fr. 33-40 (0,028-0,033M NH₄HCO₃, 1. Gradient) enthielten 140 OD₂₈₀ (10%) A β^z -5'-pp-5'-A β^z , die Fr. 79-120 (0,003-0,037M NH₄HCO₃, 2. Gradient) 970 OD₂₈₀ (68,5%) von 7 und die Fr. 155-166 (0,067-0,076M NH₄HCO₃) 87 OD₂₈₀ (6%) pA β^z . Nach Eindampfen wurde 7 mit abs. Pyridin aufgenommen und aus 100 ml abs. Äther/Cyclohexan 2:1 gefällt. Nach Zentrifugieren, Waschen mit abs. Äther, Zentrifugieren und Abdekantieren wurde im Stickstoffstrom und darauf i. HV. getrocknet: 39 mg 7 als farbloses Pulver, das DC.-einheitlich war (A, B, C). - UV. (Äthanol): 281, 256 min., 226 Sch.; $\epsilon_{256}/\epsilon_{281} = 0,57$, $\epsilon_{300}/\epsilon_{281} = 0,57$.

4. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2-(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxyguanosin (Π_d pG_d, 9), 92,7 mg (1475 OD₂₈₀) (MeOTr) Π_d pG β^z (5) wurden in 6 ml Pyridin gelöst, mit 12 ml konz. Ammoniak versetzt und 60 Std. im Dunkeln bei 23° stehengelassen, zur Trockne eingedampft und durch wiederholtes Eindampfen i. HV. mit wässrigem Äthanol von Pyridin befreit. Das DC. zeigte ein Monomethoxytrityl-haltiges Produkt ((MeOTr) Π_d pG_d, 8), das einen kleineren Rf-Wert als 5 hatte (A, B). Dann wurde mit wenig Essigsäure gelöst, mit 30 ml 50proz. wässriger Essigsäure verdünnt und 1 Std. stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung am Lyophilisierapparat bei 0,05 Torr wurde bis zum Verschwinden des Essigsäuregeruchs noch 3mal mit wässrigem Äthanol eingedampft. Das DC. zeigte die Substanz 9 und Monomethoxytritylalkohol. Der Rückstand wurde in wenig wässrigem Äthanol gelöst, mit Wasser auf 20 ml verdünnt und 3mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Nach 2maligem Waschen der organischen Phasen mit je 10 ml Wasser wurden die wässrigen Phasen vereinigt, eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 4 l 0-0,03M NH₄HCO₃ eluiert. In den Fr. 92-100 (0,016-0,017M NH₄HCO₃) waren 10 OD₂₈₀ (1%) einer Substanz (= Π_d pG β^z , nicht isoliert) enthalten, deren UV.-Spektrum mit dem von p Π_d pG β^z (16) identisch war. Die Fr. 107-140 (0,0185-0,024M NH₄HCO₃), die 903 OD₂₈₀ (95%) von Π_d pG_d (9) enthielten, wurden vereinigt und eingedampft. Lyophilisieren aus Wasser ergab 51,2 mg farblose Flocken des DC.-einheitlichen (A, B) 9. - UV. (Wasser): 254 (12125), 231 (7760), 270-275 Sch. (9820), 301 Sch. (4715); $\epsilon_{280} = 9540$.

5. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2-(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxyadenosin (Π_d pA_d, 11), 138 mg (3440 OD₂₈₀) (MeOTr) Π_d pA β^z (7) wurden in 4 ml Pyridin und 12 ml konz. Ammoniak gelöst und 48 Std. bei 23° im Dunkeln stehengelassen. Das DC. zeigte vollständige Abspaltung der Benzoylgruppe. Das nicht isolierte (MeOTr) Π_d pA_d (10) wurde bei 30°, wie in Kap. 4 beschrieben, mit Essigsäure zu Π_d pA_d (11) umgesetzt. Das rohe 11, das mit 2 Nebenprodukten verunreinigt war, wurde im wesentlichen wie in Kap. 4 beschrieben aufgearbeitet und chromatographiert. In den Fr. 17-20 (0,003-0,004M NH₄HCO₃) wurden 160 OD₂₆₀ (8%) Adenin eluiert, in den Fr. 58-70 (0,01-0,012M NH₄HCO₃) 60 OD₃₀₀ (8%) eines 2-Pyridon enthaltenden Abbauprodukts von Π_d pA_d, und in den Fr. 78-104 (0,013-0,018M NH₄HCO₃) waren 1805 OD₂₆₂ (85%) 11 enthalten. Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 76,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 11 in Form eines harten, gelblichen, hygrokopischen Schaums. - UV. (Wasser): 301,5, 262, 227 Sch.; $\epsilon_{301,5}/\epsilon_{262} = 0,38$, $\epsilon_{227}/\epsilon_{262} = 0,53$.

6. 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2-(1H)-pyridon (p Π_d , 3). In einem Reagenzglas mit Sovirelverschluss wurden bei 0° zu 1 ml abs. Phosphorsäuretriäthylester 130 μ l (1,42 mmol) POCl₃ und 12,8 μ l (0,71 mmol) Wasser gegeben. Nach 5 Min. Stehen bei 0° wurden 50 mg (0,24 mmol, 1430 OD₃₀₃) Π_d (1) zugegeben. Nach kurzem Schwenken der Suspension wurde das gut verschlossene Gefäß in ein Kältebad von -40° gestellt. Nach 2 Tagen war alles Π_d in Lösung gegangen. Nach 20 Tagen bei -40° wurde mit 10 ml Wasser bei 0° 30 Min. hydrolysiert, mit konz. Ammoniak neutralisiert und durch Abdampfen des überschüssigen Ammoniaks die Lösung auf pH 6 gebracht. Die Lösung wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht und die Säule mit einem Gradienten von 6 l 0-0,1M NH₄HCO₃ eluiert. Die Fr. wurden neben der UV.-Kontrolle mit Silbernitrat auf Chlorid-Ionen und mit Ammoniummolybdat-Reagens auf Phosphat-Ionen untersucht. Mit den Fr. 4-7 wurden 139 OD₃₀₂ (10%) Π_d eluiert. In den Fr. 75-90 (0,029-0,035M NH₄HCO₃) wurde Phosphat, in den Fr. 90-

105 (0,035-0,040M NH_4HCO_3) Chlorid gefunden. Die Fr. 164-195 (0,063-0,075M NH_4HCO_3) enthielten 1270 OD₃₀₂ (89%) $pIId$ (3). Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 74 mg DC.-reines (A, B, C, E) 3 als farblosen, harten, schwach hygroskopischen Schaum. - UV. (Wasser): 302, 225 nm; $\epsilon_{225}/\epsilon_{302} = 0,85$.

7. 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat (pA_d , 14). 31,4 mg (0,125 mmol) A_d (13) wurden in 0,5 ml abs. Phosphorsäure-triäthylester suspendiert und bei 0° mit 6,8 μl (0,38 mmol) Wasser und 69 μl (0,75 mmol) POCl_3 wie in Kap. 6 versetzt. Nach 20 Tagen bei -40° wurde hydrolysiert, mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und wie in Kap. 6 chromatographiert. In den Fr. 2-4 wurden 165 OD₂₅₉ (9%) A_d , in den Fr. 5-9 700 OD₂₅₉ (38%) Adenin eluiert. Chlorid wurde in den Fr. 45-68 (0,018-0,027M NH_4HCO_3), Phosphat in den Fr. 78-96 (0,031-0,038M NH_4HCO_3) gefunden. Vom gewünschten pA_d (14) waren in den Fr. 156-188 (0,062-0,075M NH_4HCO_3) 790 OD₂₅₉ (43%) enthalten. Eindampfen und Lyophilisieren ergab 19,3 mg pA_d als harten, gelblichen, schwach hygroskopischen, DC.-einheitlichen (A, B, C) Schaum.

8. 1-(5'-O-(β -Cyanodithylphosphoryl)-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ((CNET) $pIId$, 15). Eine Lösung von 6760 OD₃₀₂-Einheiten $pIId$ (3; 398 mg) in 20 ml Wasser wurde mit 15 ml Pyridinium-Dowex-50 15 Min. stengelassen. Dowex wurde über eine Säule abfiltriert, die Säule mit 100 ml Wasser gewaschen und die Lösung eingedampft. Der Rückstand wurde zur Trocknung mit abs. Pyridin und 3-Hydroxypropionitril i.HV. eingedampft. Anschliessend wurde in 6 ml Pyridin und 3 ml (50 Äquiv.) 3-Hydroxypropionitril gelöst und 2,6 g (10 Äquiv.) DCC zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 18 Std. bei 23° im Dunkeln gerührt und dann mit 30 ml Wasser hydrolysiert. Es wurde 3 Tage gerührt, dann über Watte von Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Niederschlag mit 10 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Nach Entfernen von Pyridin durch Einengen wurde mit Wasser auf 120 ml verdünnt und mit 80 ml, danach 2mal mit 50 ml Äther ausgeschüttelt und die organischen Phasen je 2mal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden eingedampft, der Rückstand in abs. Pyridin gelöst und 3mal aus je 80 ml Äther/Hexan 1:1 gefällt. Der resultierende Lack wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung, die 6100 OD₃₀₀ (90%) rohes 15 enthielt, auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 \times 1 cm) gebracht. Die Säule wurde in 2 Stufen eluiert: 1) Gradient von 2,4 l 0-0,018M NH_4HCO_3 , 2) Gradient von 2,6 l 0,018-0,2M NH_4HCO_3 . Die Fr. 72-98 (0,013-0,0175M NH_4HCO_3) enthielten 5800 OD₃₀₁ (86%) (CNET) $pIId$ (15), in den Fr. 169-188 (0,134-0,166M NH_4HCO_3) wurden noch 155 OD₃₀₁ (2%) $pIId$ (3) gefunden. Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 369 mg 15 als harten, gelblichen, hygroskopischen, DC.-einheitlichen (A, B, C, E) Schaum. - UV. (Wasser): 301, 226; $\epsilon_{226}/\epsilon_{301} = 0,86$, $\epsilon_{280}/\epsilon_{301} = 0,55$.

9. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N²-isobutyl-2'-desoxyguanosin ($pIId$ pG \ddot{P} , 16). Eine Lösung von 813 OD₂₈₀-Einheiten (CNET) $pIId$ (15) in 20 ml Wasser wurde mit 15 ml Pyridinium-Dowex-50 10 Min. stengelassen. Danach wurde über eine Säule von Dowex abfiltriert, die Säule mit 100 ml Wasser langsam gewaschen und die Lösung eingedampft. Durch wiederholtes Eindampfen mit abs. Pyridin wurde von Wasser befreit. Dann wurde in 4,5 ml abs. Pyridin gelöst, und es wurden 279 mg (5710 OD₂₈₀, 2 Äquiv.) pG \ddot{P} (iB) (4) und 507 mg DCC (10 Äquiv.) zugegeben. Nach 5 Tagen Rühren bei 23° im Dunkeln wurde das inzwischen dunkelbraun gewordene Gemisch mit 5 ml Pyridin verdünnt und mit 5 ml Wasser hydrolysiert. Nach 18 Std. Rühren wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, der Niederschlag mit 5 ml 50proz. Pyridin gewaschen und die Lösung nach Verdünnen mit Wasser auf 120 ml 2mal mit 80 ml Äther extrahiert. Die organischen Phasen wurden je 2mal mit 80 ml Wasser gewaschen, auf 10 ml eingengt, mit 10 ml Pyridin verdünnt und auf 0° gekühlt. Dann wurden 20 ml auf 0° vorgekühlte 2N NaOH zugegeben. Durch Zugabe von 8 ml Äthanol wurde die Lösung homogen. Nach 25 Min. bei 0° wurde mit 60 ml Pyridinium-Dowex-50 neutralisiert, über eine Säule von Dowex abfiltriert und die Säule mit 100 ml Wasser/Pyridin/Äthanol 8:1:1 gewaschen. Die orange Lösung wurde eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 \times 1 cm) gebracht und die Säule mit einem Gradienten von 10 l 0-0,25M NH_4HCO_3 gewaschen. Es wurden nacheinander eluiert (* bedeutet: bzgl. des eingesetzten pG \ddot{P} (iB)): Fr. 52-55: G \ddot{P} -5'-pp-5'-G \ddot{P} (2%*); Fr. 121-125: $pIId$ (3; 1%); Fr. 137-154: pG \ddot{P} (43%*); Fr. 166-175: pG \ddot{P} (4%*); Fr. 216-244 (0,130-0,146M NH_4HCO_3): $pIId$ pG \ddot{P} (16; 54%); Fr. 258-272: $pIId$ pG \ddot{P} (18; 5%). Die Fr. 216-244, die 1965 OD₂₈₀ von 16 enthielten, wurden vereinigt und eingedampft. Lyophilisieren ergab 98,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 16 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 260, 281, 225 Sch.; $\epsilon_{281}/\epsilon_{260} = 0,89$, $\epsilon_{300}/\epsilon_{260} = 0,56$.

10. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin ($pIId$ pA \ddot{P} , 17). 1210 OD₂₈₀-Einheiten (CNET) $pIId$ (15) wurden mit 306 mg (11340 OD₂₈₀; 1,5 Äquiv.) pA \ddot{P} (Ac) (6) und 755 mg (10 Äquiv.) DCC wie in Kap. 9 umgesetzt. Nach Auf-

arbeitung und Chromatographie wie in Kap. 9 wurde erhalten (* bedeutet: bzgl. des eingesetzten $pA_{\beta}^z(Ac)$): Fr. 104-113: pII_d (3; 38%); Fr. 132-150: pA_{β}^z (45%*); Fr. 151-162: A_{β}^z -5'-pp-5'- A_{β}^z (4%*); Fr. 195-205: $pII_d pA_d$ (19; 1%); Fr. 218-235 (0,131-0,141M NH_4HCO_3): $pII_d pA_{\beta}^z$ (17; 34%). Eindampfen der Fr. 218-235, die 3000 OD₂₈₂ von 17 enthielten, und Lyophilisieren ergaben 58 mg DC.-reines (A, B, C) 17 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 282, 243 min., 226 Sch.; $\epsilon_{243}/\epsilon_{282} = 0,46$, $\epsilon_{226}/\epsilon_{282} = 0,72$, $\epsilon_{300}/\epsilon_{282} = 0,59$.

11. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxy-guanosin ($pII_d pG_d$, 18). 589 OD₂₈₀-Einheiten (29,5 mg) $pII_d pG_{\beta}^z$ (16) wurden in 2 ml konz. Ammoniak und 1 ml Pyridin 3 Tage bei 23° im Dunkeln stehengelassen. Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (40×1 cm) gebracht. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 6 l 0-0,15M NH_4HCO_3 gewaschen. Die Fr. 162-180 (0,099-0,110M NH_4HCO_3) enthielten 400 OD₂₈₀ (94%) $pII_d pG_d$ (18). Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 24,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C, E) 18 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 254, 231, 271-276 Sch., 301; $\epsilon_{231}/\epsilon_{254} = 0,63$, $\epsilon_{271}/\epsilon_{254} = 0,82$, $\epsilon_{280}/\epsilon_{254} = 0,80$, $\epsilon_{301}/\epsilon_{254} = 0,42$.

12. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxy-adenosin ($pII_d pA_d$, 19). 50,2 mg (1530 OD₂₈₀) $pII_d pA_{\beta}^z$ (17) in 8 ml konz. Ammoniak und 2 ml Pyridin wurden wie in Kap. 11 behandelt und mit einem Gradienten von 6 l 0-0,18M NH_4HCO_3 chromatographiert (Säule 100×1 cm). Die vereinigten Fr. 178-201 (0,128-0,145M NH_4HCO_3), die 851 OD₂₆₁ 19 (84%) enthielten, wurden eingedampft. Lyophilisieren ergab 40,0 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 19 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 261, 301, 226 Sch.; $\epsilon_{301}/\epsilon_{261} = 0,39$, $\epsilon_{226}/\epsilon_{261} = 0,53$, $\epsilon_{280} = \epsilon_{301}$.

13. Enzymatische Spaltungen (vgl. theoret. Teil). Die Herstellung der Enzym- und Substratlösungen, die Durchführung der Versuche und die Trennung der Spaltprodukte durch Papierchromatographie erfolgten wie früher beschrieben [1] [29].

Enzyme. Es wurden verwendet: Schlangengiftphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus adamanteus*, Worthington Biochemical Corporation); Milzphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., Phosphodiesterase II, *Bovine Spleen*, PL Biochemical Inc.); alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1., *Escherichia coli*, Worthington Biochemical Corporation); Schlangengiftphosphodiesterase mit 5'-Nucleotidasenaktivität (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus atrox*, PL Biochemical Inc.).

Spaltung mit Phosphodiesterase I. Die Dinucleosidphosphate $II_d pG_d$ (9) und $II_d pA_d$ (11) wurden vollständig zu II_d und pG_d bzw. II_d und pA_d gespalten. Analog wurden die Dinucleotide $pII_d pG_d$ (18) und $pII_d pA_d$ (19) zu den Mononucleotiden pII_d und pG_d bzw. pII_d und pA_d abgebaut (Tab. 1).

Spaltung mit Phosphodiesterase II. Die Dinucleosidphosphate $II_d pG_d$ und $II_d pA_d$ wurden jeweils zu $II_d p$ und G_d bzw. $II_d p$ und A_d gespalten. Infolge einer Enzymverunreinigung [30] wurde A_d weiter zu Desoxyinosin abgebaut (Tab. 1).

Tabelle 1. Enzymatische Spaltungen

Enzym	Substrat	Spaltprodukte	gef. Verhältnis
Phosphodiesterase I	$II_d pG_d$	II_d , pG_d	1:1,03
	$II_d pA_d$	II_d , pA_d	1:0,90
	$pII_d pG_d$	pII_d , pG_d	1:0,95
	$pII_d pA_d$	pII_d , pA_d	1:1,02
Phosphodiesterase II	$II_d pG_d$	$II_d p$, G_d	1:1,03
	$II_d pA_d$	$II_d p$, I_d^A	1:0,99

Spaltung mit alkalischer Phosphatase. Bei den Dinucleotiden $pII_d pG_d$ (18) und $pII_d pA_d$ (19) wurden die Phosphomonoestergruppen vollständig abgespalten, was zu den Dinucleosidphosphaten

$\Pi_d pG_d$ (9) bzw. $\Pi_d pA_d$ (11) führte. Die Phosphorylierungsprodukte $p\Pi_d$ (3) und pA_d (14) wurden zu den Nucleosiden Π_d und A_d abgebaut.

Spaltung mit 5'-Nucleotidase. Durch die 5'-Nucleotidase, die als Verunreinigung in einer Phosphodiesterase I enthalten war, wurde die 5'-Phosphatgruppe in $p\Pi_d$ und pA_d vollständig abgespalten und damit die Selektivität der Phosphorylierung bewiesen. Der Abbau erfolgte innert 20 Min. bei 37°.

Spaltprodukte wurden papierchromatographisch getrennt, durch mehrmaliges Eluieren mit Wasser aus dem Papier extrahiert und die Basenzusammensetzung (theoretisch 1:1) UV.-spektroskopisch überprüft (Tab. 1).

Tabelle 2. *Rf*-Werte

Substanz	Dünnschichtchromatogramme FlieBmittel					Papierchromatogramme FlieBmittel A
	A	B	C	D	E	
Π_d (1)	0,67		0,56	0,65		0,73
(MeOTr) Π_d (2)	0,87	0,75	0,80	0,75		
$p\Pi_d$ (3)	0,20	0,20	0,36		0,37	0,22
$\Pi_d p$	0,22	0,20	0,36			0,29
(CNEt) $p\Pi_d$ (15)	0,56	0,71	0,42		0,54	
G_d		0,70				0,36
pG_d	0,08	0,30	0,15		0,30	0,06
pG_d^{ib} (4)	0,26	0,67	0,50	0,20	0,50	
A_d	0,70	0,71				0,56
pA_d (14)	0,18	0,20	0,28			0,08
pA_d^{bz} (Ac) (6)	0,36	0,38	0,47			
(MeOTr) $\Pi_d pG_d^{\text{ib}}$ (5)	0,59	0,77	0,50	0,55		
(MeOTr) $\Pi_d pG_d$ (8)	0,54	0,68		0,30		
$\Pi_d pG_d$ (9)	0,48	0,62				0,26
(MeOTr) $\Pi_d pA_d^{\text{bz}}$ (7)	0,66	0,81	0,55			
(MeOTr) $\Pi_d pA_d$ (10)	0,61		0,40			
$\Pi_d pA_d$ (11)	0,56	0,70	0,38			0,35
$p\Pi_d pG_d^{\text{ib}}$ (16)	0,22	0,45	0,30		0,47	
$p\Pi_d pG_d$ (18)	0,14	0,22	0,15			
$p\Pi_d pA_d^{\text{bz}}$ (17)	0,24	0,24	0,36			
$p\Pi_d pA_d$ (19)	0,14	0,15	0,13			
I_d	0,50					0,39

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Helv.* 60, 1182 (1977).
- [2] F. Waldmeier, Dissertation, Basel 1977.
- [3] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 55, 1196 (1972).
- [4] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure appl. Chemistry* 40, 277 (1974); J. H. Van de Sande, M. H. Caruthers, A. Kumar & H. G. Khorana, *J. biol. Chemistry* 251, 571 (1976).
- [5] N. Cerletti, Dissertation, Basel 1976.
- [6] J. Gregor, U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 58, 712 (1975).
- [7] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Heterocycles* 5, 245 (1976).
- [8] P. O. P. Ts'ao, 'Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry', Vol. II, Acad. Press, N.Y. 1974, S. 47; H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3821 (1963).
- [9] P. T. Gilham & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 6212 (1958).
- [10] R. J. Zhdanov & S. M. Zhenodarova, *Synthesis* 1975, 222.
- [11] H. Kössel & H. Seliger, *Fortschr. Chem. org. Naturst.* 32, 297 (1975).
- [12] V. Amarnath & A. D. Brown, *Chem. Rev.* 77, 183 (1977).
- [13] P. Cashion, K. Porter, T. Cadger, G. Sathe, T. Tranquilla, H. Notman & E. Jay, *Tetrahedron Letters* 1976, 3769; F. Ramirez, E. Evangelidou-Tsolis, A. Jankowski & J. F. Marecek, *J. org. Chemistry* 42, 3144 (1977); R. Arentzen & C. B. Reese, *J. chem. Soc. Perkin I* 1977, 445.

- [14] *W. Büchi & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* **72**, 251 (1972).
[15] *H. Weber & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* **72**, 219 (1972).
[16] *D. G. Knorre & V. F. Zarytova*, *Nucl. Acids Res.* **3**, 2709 (1976).
[17] *H. Köster & W. Kaiser*, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 336.
[18] *H. Schott & H. Kössel*, *J. Amer. chem. Soc.* **95**, 3778 (1973).
[19] *R. K. Ralph & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2926 (1961).
[20] *S. A. Narang & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2988 (1965).
[21] *H. Schaller & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3828 (1963).
[22] *A. Franke, K. H. Scheit & F. Eckstein*, *Chem. Ber.* **101**, 2998 (1968).
[23] *G. M. Tener*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).
[24] *G. A. LePage, Y. T. Lin, R. E. Orth & J. A. Gottlieb*, *Cancer Res.* **32**, 2441 (1972); *S. S. Cohen*, *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1929 (1975).
[25] *L. A. Slotin*, *Synthesis* **1977**, 623.
[26] *M. Yoshikawa, T. Kato & T. Takenishi*, *Bull. chem. Soc. Japan* **42**, 3505 (1969); *T. Sowa & S. Ouchi*, *ibid.* **48**, 2084 (1975).
[27] *G. R. Revankar, J. H. Huffman, L. B. Allen, R. W. Sidwell, R. K. Robins & R. L. Tolman*, *J. med. Chemistry* **18**, 721 (1975); *C. I. Hong, G. L. Tritzsch, A. Mittelman, P. Hebborn & G. B. Chheda*, *ibid.* **18**, 465 (1975).
[28] *P. O. P. Ts'ao*, 'Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry', Vol. II, Acad. Press, N.Y. 1974, S. 118, S. 323.
[29] *U. Séquin*, *Helv.* **57**, 68 (1974).
[30] *K. K. Ogilvie & R. L. Letsinger*, *Biochem. biophysics Res. Commun.* **30**, 273 (1968).
[31] *A. Kumar & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 2743 (1969).

161. Cyclooct-1-en-5-yne. Preparation, Spectroscopic Characteristics and Chemical Reactivity¹⁾

by **Werner Leupin** and **Jakob Wirz**

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel, Klingelbergstrasse 80, CH-4056 Basel, Switzerland

(22.III.78)

Summary

Cyclooct-1-en-5-yne (**3**) has been obtained as an isolable, but highly reactive hydrocarbon by oxidation of cyclooct-5-ene-1,2-dihydrazone with lead tetraacetate (*Scheme 2*). Information regarding the structure and conformational mobility of **3** has been gained from the analysis of its ¹H- and ¹³C-NMR. spectra and was found to agree with the results of force field calculations. Photolysis (206 nm) of **3** in solution has induced cleavage to butatriene and butadiene. The first band in the photoelectron spectrum of **3** (I_v 9.10 eV) is attributed to ionization from a rather delocalized orbital with predominant weight of the double bond p-AO's. Nevertheless, the high reactivity of **3** stems from the strained triple bond as evidenced by the reaction products obtained by pyrolysis, oxidation, *Diels-Alder* addition, and 1,3-dipolar addition (*Scheme 4*).

¹⁾ Presented at the Swiss Chemical Society meeting, 7.10.1977.