

**264. Nucleoside und Nucleotide. Teil 15. Synthese von
Desoxyribonucleosid-monophosphaten und -triphosphaten mit
2(1H)-Pyrimidinon, 2(1H)-Pyridinon und 4-Amino-2(1H)-pyridinon
als Basen^{1) 2)}**

von Peter Kohler, Michael Wachtl und Christoph Tamm³⁾

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

(8.IX.80)

**Nucleosides and Nucleotides. Part 15. Synthesis of Deoxyribonucleoside Monophosphates and
Triphosphates with 2(1H)-Pyrimidinone, 2(1H)-Pyridinone and 4-Amino-2(1H)-pyridinone as the Bases**

Summary

The phosphorylation of the modified nucleosides 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinone (M_d , **4**), 4-amino-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone (Z_d , **6**) and the synthesis of 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinone-5'-O-triphosphate ($pppM_d$, **1**), 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-O-triphosphate ($ppp\Pi_d$, **2**), and 4-amino-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-O-triphosphate ($pppZ_d$, **3**) are described. The nucleoside-5'-monophosphates pM_d (**5**) and pZ_d (**7**) were obtained by selective phosphorylation of M_d (**4**) and Z_d (**6**), respectively, using phosphorylchloride in triethyl phosphate or in acetonitril. The reaction of pM_d (**5**), $p\Pi_d$ (**8**) or pZ_d (**7**) with morpholine in the presence of DCC led to the phosphoric amides **9**, **10** and **11**, respectively, which were converted with tributylammonium pyrophosphate in dried dimethylsulfoxide to the nucleoside-5'triphosphates **1**, **2** and **3**, respectively.

1. Einleitung. – Im Rahmen unserer Untersuchungen über die DNA- bzw. RNA-Polymerasenspezifität mit Hilfe von Nucleotiden, deren Base nur beschränkt fähig ist, Wasserstoffbrücken zu natürlichen Nucleotiden auszubilden, haben wir die Synthese von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-O-triphosphat ($pppM_d$, **1**⁴⁾) 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-O-triphosphat ($ppp\Pi_d$, **2**) und 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-triphosphat ($pppZ_d$, **3**) durchgeführt. Anschliessend wurde das Verhalten dieser Verbindungen gegenüber der DNA-Polymerase untersucht [5].

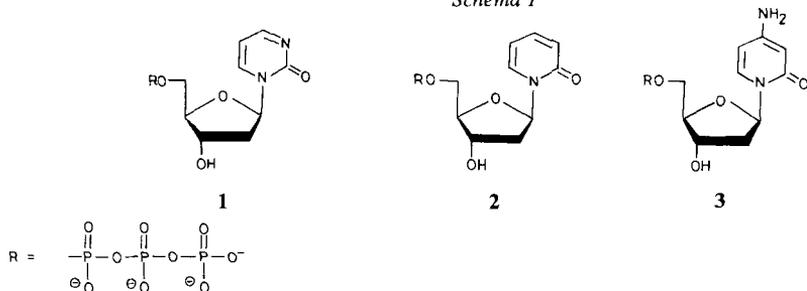
¹⁾ Teil 14 s. [1].

²⁾ Für Einzelheiten vgl. [2][3].

³⁾ Korrespondenz-Autor.

⁴⁾ Zu den Abkürzungen vgl. [4]. M_d = 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon, Π_d = 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon und Z_d = 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon.

Schema 1

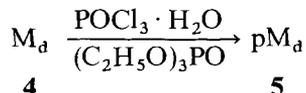


Der Weg zur Herstellung von Nucleosid-5'-triphosphaten führt über eine selektive Phosphorylierung der Nucleoside in 5'-Stellung und anschliessende Umsetzung der Nucleosid-5'-phosphate, direkt oder über eine reaktive Zwischenverbindung, mit Pyrophosphat.

Über die Synthese von Π_d [6][7], $p\Pi_d$ (**8**) [8][9], M_d (**4**) [10] und Z_d [11][12] haben wir und andere Autoren bereits berichtet.

2. Phosphorylierung von M_d (4**) zu pM_d (**5**).** – Die Phosphorylierungsversuche von M_d (**4**) mit Chlorphosphorsäure-bis(2,2,2-trichloräthylester) nach der Methode von *Francke et al.* [13] sowie mit Cyanoäthylphosphat nach dem klassischen Verfahren von *Tener* [14] ergaben unbefriedigende Resultate. Die Entfernung der Schutzgruppen, die bei der Verwendung dieser Methoden nötig sind, verursachte die Spaltung der glycosidischen Bindung. Es entstand 2-Hydroxypyrimidin, was durch das Auftreten des Absorptionsmaximums bei 292 nm im UV.-Spektrum festgestellt wurde.

Schliesslich wurde pM_d (**5**) durch Phosphorylierung von M_d (**4**) mit Phosphorylchlorid in Phosphorsäure-triäthylester nach *Yoshikawa et al.* [15] hergestellt, wobei die glycosidische Bindung erhalten blieb.

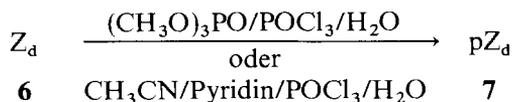


Bei 0° wurde **4** mit 2,5 Mol-Äquiv. Phosphorylchlorid, das vorher mit 0,7 Mol-Äquiv. Wasser behandelt worden war, in Phosphorsäure-triäthylester umgesetzt. Nach Ausfällung des Produktes aus Äther, wobei überschüssiges Phosphorylchlorid und Lösungsmittel im Äther löslich sind, wurde mit Ammoniumhydrogencarbonat neutralisiert und 15 Stunden bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die Trennung auf einer *DEAE-Sephadex*-Säule lieferte neben Ausgangsmaterial und höheren Phosphaten pM_d (**5**) in einer Ausbeute von 61,5% als Ammoniumsalz.

3. Phosphorylierung von Z_d (6**) zu pZ_d (**7**)⁵⁾.** – Das Nucleosid **6** wurde sowohl nach der oben erwähnten Methode von *Yoshikawa* wie auch nach dem Verfahren von *Sowa & Ouchi* [16] phosphoryliert. Im letzteren Falle diente ein genau

⁵⁾ Die Phosphorylierung dieses Nucleosids sowie die weitere Umsetzung zum Triphosphat wurde sowohl mit dem β - wie auch mit dem α -Anomeren durchgeführt. Unterschiede im chemischen Verhalten der beiden Anomeren waren nicht festzustellen (vgl. [3]).

definiertes Gemisch von Phosphorylchlorid, Pyridin und Wasser in Acetonitril als Phosphorylierungsreagenz.



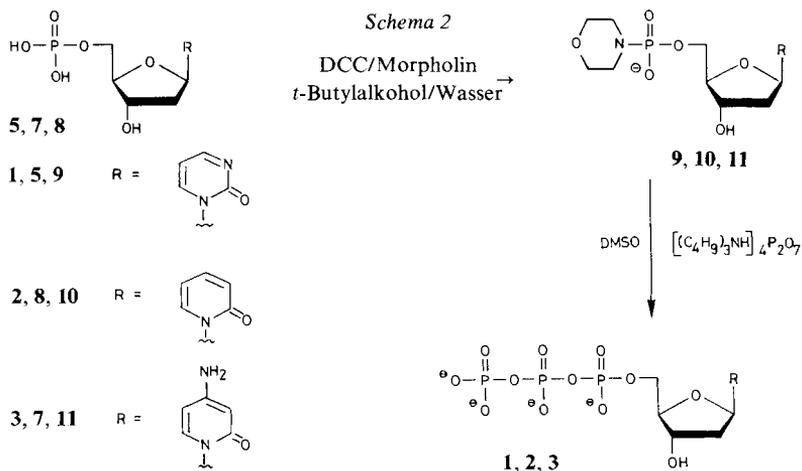
Die Ausbeute von **7** betrug nach Methode [16] bei einer Reaktionstemperatur von 0° ca. 50%. Deshalb versuchten wir analog zu *Waldmeier & Tamm* [9] die Reaktion durch eine Senkung der Temperatur zu optimieren. Bei –20° wurden schliesslich die besten Ausbeuten erzielt. Die Phosphorylierung in Acetonitril verlief wesentlich schneller als in Phosphorsäure-trimethylester; so betrug die optimale Reaktionsdauer 24 Stunden bzw. 5 Tage. Saure, wässrige Hydrolyse führte innert 30 Minuten zum Rohprodukt, das durch einen flach verlaufenden Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten an einer *DEAE-Sephadex*-Säule gereinigt wurde. Das DC.-einheitliche pZ_d (**7**) wurde in einer Ausbeute von 75% isoliert.

4. Konstitution der beiden Nucleosid-5'-phosphate **5 und **7**.** – Die UV.-Spektren von **5** und **7** zeigen die gleichen Absorptionsmaxima wie die entsprechenden Nucleoside **4** und **6**, womit gesichert ist, dass keine Spaltung der glycosidischen Bindung eingetreten war.

Neben der spektroskopischen und chromatographischen Charakterisierung wurden auch enzymatische Methoden herangezogen [8]. Nucleosid-5'-phosphate werden von der alkalischen Phosphatase und dem rohen Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* dephosphoryliert. Die im Schlangengift enthaltene 5'-Nucleotidase greift nur 5'-Nucleotide mit einer freien 3'-OH-Gruppe an. Da die Nucleotide **5** und **7** von beiden Enzymen vollständig abgebaut wurden, ist ihre Konstitution als 5'-Phosphate bewiesen.

5. Umsetzung von pM_d (5**), pII_d (**8**) und pZ_d (**7**) zu $pppM_d$ (**1**), $pppII_d$ (**2**) und $pppZ_d$ (**3**).** – Die Synthesen der Nucleosid-5'-triphosphate **1–3** wurden nach dem klassischen Verfahren von *Moffat & Khorana* [17][18] über die Phosphoramide **9–11** durchgeführt (vgl. *Schema 2*).

Die Ammoniumsalze von **5**, **7** und **8** wurden mittels *Dowex 50W* in die freie Säureform übergeführt, in Wasser/*t*-Butylalkohol/Morpholin gelöst, unter Rückfluss



erhitzt und mit DCC in *t*-Butylalkohol langsam versetzt. Der Ablauf der Reaktion wurde im Dünnschichtchromatogramm verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das überschüssige DCC entfernt und das Rohprodukt durch Verteilen zwischen Wasser und Äther gereinigt. Die Phosphoramide **9–11** konnten schliesslich nach Ausfällen in Äther als Salze des *N,N*-(3-Oxa-pentamethylen)-*N',N''*-dicyclohexylguanidinium-Ion in Ausbeuten zwischen 90 und 95% isoliert werden.

Der Beweis, dass die intermediären Phosphoramide **9–11** über keine freien 5'-Phosphatgruppen mehr verfügten, wurde durch Spaltversuche mit alkalischer Phosphatase und rohem Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* erbracht. Keines der drei Phosphoramide wurde von diesen Enzymen gespalten. Die UV.-Spektren von **9–11** zeigten die gleichen Absorptionsmaxima wie die entsprechenden Nucleoside bzw. Nucleosid-5'-phosphate. Im IR.-Spektrum tauchten bei 2940 und 2890 cm^{-1} zwei neue scharfe Banden auf, die als *Bohlmann*-Banden für *N,N*-disubstituierte Amide gedeutet werden können.

Die vorgetrockneten Phosphoramide **9–11** wurden mit einem Überschuss an Tributylammoniumpyrophosphat in abs. DMSO während 45–52 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Nach der Hydrolyse wurde das Gemisch auf einer *DEAE-Sephadex*-Säule chromatographiert. Nach Lyophilisieren wurde **3** als DC.-reines Ammoniumsalz in einer Ausbeute von 72% isoliert. Die Triphosphate **1** und **2** wurden nach der Chromatographie noch zusätzlich durch Umsetzung der Ammoniumsalze in einer 1proz. NaClO_4 -Lösung in die Natriumsalze der Nucleotide übergeführt. Auf diese Weise wurden **1** und **2** in einer Ausbeute von 61 bzw. 85% isoliert. Die Charakterisierung erfolgte wiederum mit enzymatischen Methoden.

Mit dem rohen Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* liessen sich die Verbindungen **1–3** nicht abbauen, wodurch die 5'-Monophosphat-Struktur ausgeschlossen war. Mit alkalischer Phosphatase in kleiner Konzentration und mit verkürzter Inkubationsdauer wurden die einzelnen Abbaustufen vom Triphosphat bis zum Nucleosid auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar. Der Vergleich zum analogen Abbau von 2'-Desoxyribosylthymidin-5'-triphosphat bzw. den Rf-Werten der durchlaufenen Zwischenstufen bestätigte die Konstitution von **1–3**.

Tabelle. Rf-Werte

Substanz	Dünnschichtchromatogramme, Fließmittel				
	A	B	C	D	E
M_d (4)	0,58		0,63		0,45
Z_d (6)	0,60	0,66			0,51
pM_d (5)			0,55		
pII_d (8)	0,25	0,20	0,46	0,13	
pZ_d (7)	0,19	0,26			0,26
Mor. pM_d (9)			0,68		
Mor. pII_d (10)	0,65	0,55		0,42	
Mor. pZ_d (11)		0,56			0,32
$pppM_d$ (1)			0,34		
$pppII_d$ (2)			0,15		
$pppZ_d$ (3)	0,03	0,05			0,09

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 2.435.0.75, 2.629.0.76 und 2.158.0.78) für die finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines*. S. [1]. Abweichungen bzw. Ergänzungen: Die UV.-Spektren wurden mit einem Beckmann-UV.-Spektrometer, Modell 25, aufgenommen; Angabe von λ_{\max} in nm (ϵ). – Fließmittelsysteme für die DC. (v/v): A) 2-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 7 : 1 : 2; B) Äthanol/1M Ammoniumacetat (pH 7,5) 7 : 3; C) Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 6 : 1 : 3; D) *t*-Butylalkohol/Methyläthylketon/Wasser/konz. Ammoniak 4 : 3 : 2 : 1; E) Butanol/Essigsäure/Wasser 5 : 2 : 3. – Für die Ionenaustauschchromatographie wurden die Säulen in der Hydrogencarbonatform vorbereitet. Die Fraktionengrösse betrug 23–26 ml bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,53–1,67 ml/Min. Fr. = Fraktion. – Bei den Phosphorylierungen wurde Phosphorsäure-triäthyl- und -trimethylester (*pract.*, von Fluka, Buchs; über Molekularsieb 4 Å getrocknet) verwendet. Phosphorylchlorid (*suprapur.*) wurde bei E. Merck AG, Darmstadt, bezogen. – Für die enzymatischen Spaltungen wurden folgende Enzyme verwendet: Schlangengiftphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus adamanteus*; Worthington Biochemical Corporation) und alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1., *Escherichia coli*; Worthington Biochemical Corporation). Die Herstellung der Enzym- und Substratlösungen und die Durchführung der Versuche erfolgte nach [6].

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon (M_d , **4**) wurde nach [10] hergestellt. Kristallisation aus Methanol ergab **4** in farblosen Nadeln vom Smp. 136–138°. – UV. (Methanol): 308 (5700), 213 (9750).

4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon (Z_d , **6**) wurde in einem leicht abgeänderten Verfahren [3] nach [11] hergestellt. Kristallisation aus Äthanol/Petroläther lieferte feine Nadeln vom Smp. 196–197,5° ([11]: 193–194°). – UV. (Wasser): 258 (8280), 218 (18600).

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5-O'-phosphat (pP_d , **8**) wurde nach [8] hergestellt. Als Lyophilisat liefert das Ammoniumsalz einen farblosen, leicht hygroscopischen Schaum. – UV. (Wasser): 302, 225; $\epsilon_{225}/\epsilon_{302} = 0,85$.

2. *Herstellung von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5-O'-phosphat (pM_d , **5**)*. Ein Gemisch von 233 mg (0,140 ml, 1,52 mmol) Phosphorylchlorid und 2 ml abs. Phosphorsäure-triäthylester wurde bei 0° mit 10 μ l Wasser versetzt und 5 Min. gerührt. Dieses Reagens wurde zu 130 mg (0,16 mmol) **4** gegeben und bei 0° gerührt. Nach 10 Min. war **4** gelöst. Die Reaktion wurde durch DC. (C) verfolgt. Nach 2 Std. wurde das Gemisch in 100 ml Äther getropft, wobei ein dichter, weisser Niederschlag entstand. Dieser wurde zentrifugiert und 3mal mit Äther gewaschen. In Eiswasser gelöst, ergab der Niederschlag eine klare Lösung, welche mit 0,5M NH_4HCO_3 auf pH = 8 gestellt wurde. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT. zur Hydrolyse stehengelassen und dann auf einer DEAE-Sephadex-A-25-Säule (60 \times 1,5 cm) chromatographiert. Es wurde mit einem Gradienten von 4 Liter 0–0,3M NH_4HCO_3 in Wasser eluiert. Die Fr. 21–30 enthielten **4** (7%) und die Fr. 60–72 (0,10–0,11M NH_4HCO_3) 122,4 mg (61,5%) pM_d (**5**), das nach Lyophilisieren aus 40 ml Wasser als farbloser Schaum resultierte. – UV. (Wasser): 303.

Mit alkalischer Phosphatase und rohem Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* wurde **5** vollständig zu **4** abgebaut. Die Identifizierung erfolgte mittels DC. (C).

3. *Herstellung von 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-O-phosphat (pZ_d , **7**)*. In eine Lösung von 162 μ l (1,76 mmol) $POCl_3$, 136 μ l (1,76 mmol) trockenem Pyridin, 18 μ l (0,88 mmol) Wasser und 500 μ l Acetonitril (von Fluka AG, Buchs; *puriss.*, *p.a.* über Molekularsieb 4 Å) wurden bei 0° unter Rühren langsam 100,8 mg (0,44 mmol) Z_d (**6**) gegeben. Innert 5 Min. entstand eine klare Lösung, die für weitere 24 Std. bei –20° stehengelassen wurde. Danach zeigte das DC. fast keinen Reaktanten mehr. Nach Zugabe von 5 g Eis wurde zuerst $\frac{1}{2}$ Std. bei 0° und dann $\frac{1}{2}$ Std. bei RT. hydrolysiert. Danach wurde die saure Lösung langsam mit konz. Ammoniak neutralisiert und an einer DEAE-Sephadex-Säule (100 \times 1 cm, Hydrogencarbonatform) chromatographiert. Es wurde mit einem Gradienten von 6 Liter 0–0,15M NH_4HCO_3 in Wasser eluiert. Neben der UV.-Kontrolle wurden die gesammelten Fr. mit Silbernitratlösung auf Chlorid-Ionen und mit Ammoniummolybdat-Reagens auf Phosphat-Ionen untersucht. Mit den Fr. 3–10 wurden 530 OD.₂₅₉ (14,5%) Z_d (**6**) eluiert. In den Fr. 60–80 (0,038–0,050M NH_4HCO_3) wurde Chlorid, in den Fr. 85–100 (0,053–0,063M NH_4HCO_3) Phosphat gefunden. Die Fr. 107–161 (0,067–0,101M NH_4HCO_3) enthielten 2703 OD.₂₅₉ (71%) pZ_d (**7**), wurden vereinigt und durch mehrmaliges vorsichtiges Eindampfen von NH_4HCO_3 befreit. Anschliessendes Lyophilisieren der wässrigen Lösung lieferte 113 mg (74%) pZ_d (**7**) als farblosen Schaum. Das Präparat zeigte keine Verunreinigungen im DC. (A, B, E). Mit der

alkalischen Phosphatase und rohem Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* liess sich pZ_d (7) quantitativ zu Z_d (6) abbauen. – UV. (Wasser; Ammoniumsalz von 7): 259 (8330), 216 (27090).

4. *Herstellung von Nucleosid-5'-phosphormorpholidaten, allgemeines Verfahren.* Zu einer Lösung von 0,19 mmol Nucleosidmonophosphat (Ammoniumsalz) in 10 ml Wasser wurden 2 ml Dowex 50W (H⁺-Form) gegeben. Nach 30 Min. Stehenlassen wurde das Gemisch über eine Säule filtriert und mit 500 ml Wasser gewaschen. In der Vorlage befanden sich 0,5 ml Morpholin. Die Waschlösung wurde i.V. eingedampft und dann mit 3 ml Wasser/*t*-Butylalkohol 1:1 und 80 µl Morpholin (0,87 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde zum Sieden gebracht und unter Rühren mit einer Lösung von 180 mg (0,87 mmol) DCC in 2 ml *t*-Butylalkohol langsam versetzt. Nach 4,5 Std. Kochen unter Rückfluss wurde das Gemisch abgekühlt, das überschüssige DCC mit 10 ml Wasser hydrolysiert und der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft, mit 25 ml Wasser versetzt und 3mal mit 25 ml Äther extrahiert. Die Wasserphase wurde eingedampft und der Rückstand in wenig abs. Methanol aufgenommen. Die methanolische Lösung wurde in 40 ml Äther getropft, wobei ein feiner, weisser Niederschlag resultierte. Dieser wurde nach Abdekantieren und Abkratzen von den Wänden des Gefässes i.HV. getrocknet. Es resultierte im DC. einheitliches amorphes Morpholidat. Das Präparat war jeweils weder durch alkalische Phosphatase noch durch rohes Schlangengift aus *Crotalus adamanteus* abbaubar.

1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-O-phosphormorpholidat (Mor. pM_d, 9) wurde als Rohprodukt in 100proz. Ausbeute erhalten. DC. (C) einheitlich. Für die Reaktion zum Triphosphat wurde rohes 9 verwendet. – UV.: 314.

1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-O-phosphormorpholidat (Mor. pII_d, 10) wurde in einer Ausbeute von 91% als amorphes Pulver (Monohydrat) erhalten, DC.-einheitlich (A, B, D). – UV. (Äthanol): 303 (6310), 199 (27230), 215 (2180) Sch. – IR. (KBr): u.a. 2850, 2940 (N,N-disubst. Amid, Bohlmann-Banden); 1650 (C=O, Pyridinon-Ring); 1050, 1110, 1250 (P=O, PO-C).

C₃₁H₅₄N₅O₉P (671,8) Ber. C 55,42 H 8,10 N 10,43% Gef. C 54,95 H 8,31 N 10,14%

4-Amino-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-pyridinon-5'-O-phosphormorpholidat (Mor. pZ_d, 11) wurde in einer Ausbeute von 89% (Monohydrat) erhalten, im DC.-einheitlich (B, E). – UV. (Wasser): 259 (8470), 218 (37730). – IR. (KBr): u.a. 3210, 2350 (NH, primäres Amin), 2850, 2940 (Bohlmann-Banden), 1650 (C=O, Pyridinon-Ring).

C₃₁H₅₅N₆O₉P (688,8) Ber. C 54,05 H 8,34 N 12,20% Gef. C 53,45 H 7,95 N 12,03%

5. *Herstellung der Nucleosid-5'-triphosphate, allgemeines Verfahren.* Eine Lösung von 244 mg (0,55 mmol) Natriumpyrophosphat in 10 ml Wasser wurde mit 2 ml Dowex 50W (Pyridiniumform) versetzt. Nach ½ Std. Rühren wurde das Gemisch filtriert und der Ionenaustauscher mit 200 ml Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde eingedampft, mit 2 ml Pyridin und 1 ml Tributylamin versetzt, erneut eingedampft und der Rückstand durch mehrmaliges Abdampfen mit abs. Pyridin und abs. Benzol i. HV. getrocknet. Das erhaltene Pyrophosphat wurde in 8 ml abs. DMSO gelöst, mit 0,120 mmol Phosphoramid 9–11 versetzt und wie oben beschrieben getrocknet. Die klare Lösung wurde unter Feuchtigkeitsausschluss 45–52 Std. im Dunkeln bei RT. gerührt, dann mit 5 ml Wasser versetzt und auf einer DEAE-Sephadex-Säule (100 × 1 cm, Hydrogencarbonatform) chromatographiert.

1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-O-triphosphat (pppM_d, 1). Reaktionsdauer 45 Std. Gradient von 6 Liter 0–0,5M (C₂H₅)₃HNHCO₃ in Wasser. Fr. 50–60 pM_d (3%), Fr. 86–92 ppM_d (2,6%), Fr. 133–172 (0,27–0,32M (C₂H₅)₃HNHCO₃) pppM_d (1; 61%). Die Fr. 133–172 wurden vereint und eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Methanol gelöst und in 10 ml 1proz. NaClO₄-Lösung in Aceton getropft. Es entstand ein gelblich-weisser Niederschlag. Dieser wurde abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Es resultierte als gelbliches Pulver das Natriumsalz von 1. – UV. (Wasser): 302,5 (3020), 215,5 (5035). – IR. (KBr): u.a. 1650 (C=O, Pyrimidinon-Ring), 1245, 1090 und 900 (P=O, PO-C, P-O-P).

1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-O-triphosphat (pppII_d, 2). Reaktionsdauer 48 Std. Gradient von 6 Liter 0–0,5M (C₂H₅)₃HNHCO₃ in Wasser. Fr. 22–99 Mor. pII_d (4%), Fr. 69–79 pII_d (4%), Fr. 111–121 ppII_d (7%), Fr. 154–181 (0,29–0,35M (C₂H₅)₃HNHCO₃) pppII_d (2; 85%). Das Material der Fr. 154–181 wurde in der gleichen Weise wie oben ins Na-Salz übergeführt. – UV. (Wasser): 298 (5920), 224 (5190), 192 (15960). – IR. (KBr): 1655 (C=O, Pyridinon-Ring), 1255, 1090, 1000 und 900 (P=O, P-O-C, P-O-P).

C₁₀H₁₂N₁Na₄O₁₃P₃ Ber. C 22,3 H 2,2 N 2,6% Gef. C 23,6 H 2,9 N 2,5%

4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-O-triphosphat (pppZ_d, **3**). Reaktionsdauer 52 Std. Gradient von 6 Liter 0–0,4M NH₄HCO₃ in Wasser. Fr. 27–32 Mor. pZ_d (**11**; 6,6%), Fr. 74–80 pZ_d (**7**; 18,5%), Fr. 130–142 (0,22–0,24M NH₄HCO₃) pppZ_d (**3**; 69%). Eindampfen und Lyophilisieren ergab **3** als farblosen, DC.-einheitlichen (A, B, E) Schaum (Ammoniumsalz). – UV. (Wasser) 259 (7850), 216 (28551).

Durch alkalische Phosphatase wurden **1–3** stufenweise bis zum Nucleosid abgebaut.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. Bühlmayer & Ch. Tamm, *Helv.* **63**, 0000 (1980).
- [2] P. Kohler, Dissertation, Basel 1974.
- [3] M. Wachtl, Dissertation, Basel 1980.
- [4] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **40**, 277 (1974).
- [5] M. Wachtl, P. Kohler & Ch. Tamm, *Helv.* **63**, 0000 (1980).
- [6] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* **52**, 1219 (1969).
- [7] M. P. Mertes, *J. Med. Chem.* **13**, 149 (1970).
- [8] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* **55**, 1196 (1972).
- [9] F. Waldmeier & Ch. Tamm, *Helv.* **61**, 1648 (1978).
- [10] P. Kohler, E. Volz, U. Séquin & Ch. Tamm, in *Nucleic Acid Chemistry*, Part. 1, Herausgeber L. B. Townsend & R. S. Tipson, Wiley-Interscience, S. 283.
- [11] B. L. Currie, R. K. Robins & M. J. Robins, *J. Heterocycl. Chem.* **7**, 323 (1970).
- [12] P. D. Cook, R. T. Day & R. K. Robins, *J. Heterocycl. Chem.* **14**, 1295 (1977).
- [13] A. Franke, K. H. Scheit & F. Eckstein, *Chem. Ber.* **101**, 2998 (1968).
- [14] G. M. Tener, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 649 (1961).
- [15] M. Yoshikawa, T. Kato & T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **42**, 3505 (1969).
- [16] T. Sowa & S. Ouchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **48**, 2084 (1975).
- [17] J. G. Moffat & H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 649 (1961).
- [18] J. G. Moffat, *Can. J. Chem.* **42**, 599 (1964).