

2'-DESOXYTUBERCIDIN: SYNTHESE DES O-3'-PHOSPHORAMIDITES UND KONDENSATION ZU 2'-DESOXYTUBERCIDYLYL(3' → 5')-2'-DESOXYTUBERCIDIN

FRANK SEELA* und ANDREAS KEHNE

Laboratorium für Bioorganische Chemie, Fachbereich 13, Organische Chemie, Universität Paderborn, Warburger Str. 100, D-4790 Paderborn, Bundesrepublik Deutschland

(Received in Germany 7 October 1984)

Zusammenfassung—Das 2'-Desoxytubercidin-Phosphoramidit **2** wurde aus **1** nach N⁴-Benzoylierung zu **3a**, O-5'-Dimethoxytritylierung zu **3b** und Phosphitylierung mit Chlordiisopropylaminomethoxyphosphan dargestellt. Kondensation von **2** mit O-3'-silyliertem **3e** führt über das vollgeschützte **4b** zu 2'-Desoxytubercidylyl(3' → 5')-2'-desoxytubercidin (**4a**). Das dem 2'-Desoxyadenosyl(3' → 5')-2'-desoxyadenosin (d(ApA)) isomere **4a** weist bei 270 nm eine Hypochromizität von 11% und damit starke stacking-Wechselwirkungen auf. Hydrolyse von **4a** mit Nuclease S₁ erfolgt fünfmal schneller als bei d(ApA). Dies weist darauf hin, dass das Enzym neben seiner Einzelstrangspezifität auch die Geometrie des Basenstackings erkennt.

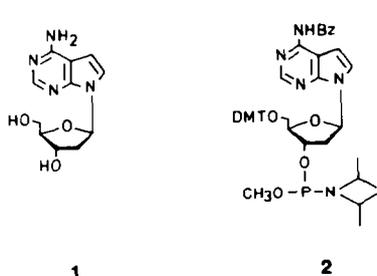
Abstract—The phosphoramidite of 2'-deoxytubercidin (**2**) has been prepared by phosphitylation of compound **3b** with chlorodiisopropylaminomethoxyphosphane. The intermediate **3b** was obtained from 2'-deoxytubercidin (**1**) by N⁴-benzoylation and subsequent O-5'-dimethoxytritylation. Condensation of compound **2** with O-3'-silylated **3e** gave the fully protected dimer **4b**, which was converted into 2'-deoxytubercidylyl(3' → 5')-2'-deoxytubercidin (**4a**). Compound **4a** isomeric with 2'-deoxyadenosyl(3' → 5')-2'-deoxyadenosine (d(ApA)) exhibits a hypochromicity of 11% (270 nm) due to strong stacking interactions. Cleavage of the dinucleoside monophosphate **4a** with nuclease S₁ occurs five times faster than that of d(ApA). This shows that the single strand specific enzyme recognises the geometry of the stacked nucleobases.

Unter den Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-Nucleosiden¹ spielt Tubercidin² eine besondere Rolle. Es ist ein natürlich vorkommendes Isoster des Adenosins, jedoch mit anderen biologischen Eigenschaften.³ Es ist nicht nur antibiotisch, sondern auch antineoplastisch wirksam;⁴ durch Enzyme wie Adenosin-Desaminase nicht mehr umwandelbar⁵ und vermag im Polynucleotidverband nur Watson-Crick-, jedoch keine Hoogsteen-Basenpaare mehr auszubilden.⁶

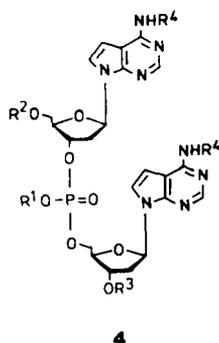
Im Gegensatz zu Tubercidin ist die 2'-

Desoxyverbindung **1** bisher nicht aus natürlichen Quellen isoliert worden. Die Darstellung erfolgte entweder enzymatisch als Triphosphat,^{7,8} durch Partialsynthese aus der fermentativ gewonnenen D-Riboverbindung⁹ oder durch Totalsynthese mittels Phasentransferglycosylierung von 4-Amino-2-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin mit der entsprechenden Halogenose.¹⁰

Seit einiger Zeit untersuchen wir den Einbau isomereer Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-Nucleoside in



	R ¹	R ²	R ³
3a	H	H	Bz
b	H	DMT	Bz
c	H	DMT	H
d	SiI	DMT	Bz
e	SiI	H	Bz
f	H	H ₂ O ₃ P	H



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
4a	H	H	H	H
b	OCH ₃	DMT	SiI	Bz
c	OH	DMT	SiI	Bz
d	OH	DMT	H	Bz
e	OH	H	H	Bz

DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl

SiI = tert-Butyldimethylsilyl

Bz = Benzoyl

Oligo-¹¹ und Polynucleotide.¹² Diese gezielte Modifikation einer DNA- oder RNA-Sequenz kann Aufschlüsse über die Sekundär- und Tertiärstruktur der Nucleinsäurehelix und auch über ihre Wechselwirkung mit Enzymen erbringen.¹³ Andererseits stellt der Einbau einer "unnatürlichen" Base in den DNA-Duplex eine Punktmutation dar, die im Normalfall wieder repariert werden kann. Erfolgt diese Reparatur nicht durch Hydrolyse der Internucleotidbindung, sondern wie bei den Transglycolasen¹⁴ durch Hydrolyse der glycosylischen Bindung, so ist zu erwarten, dass diese bei 2'-Desoxytubercidin-haltigen Sequenzen stark eingeschränkt ist, da 1 im Gegensatz zu 2'-Desoxyadenosin eine relativ stabile N-glycosylische Bindung besitzt.¹⁰

Vor einiger Zeit haben Beaucage und Caruthers¹⁵ und McBride und Caruthers¹⁶ gezeigt, dass Nucleosidphosphoramidite *in situ* aktivierbare Spezies darstellen, die entweder in Lösung oder am polymeren Träger zur Synthese von Oligonucleotiden eingesetzt werden können. — Bisher hat man im wesentlichen Phosphoramidite von Nucleosiden mit regulären Basen dargestellt. Wir beschreiben im folgenden die Synthese des dem 2'-Desoxyadenosin isosteren Phosphoramidites 2¹⁷ und zeigen anhand der Darstellung des Dinucleosidmonophosphates 4a, dass es sich wie die Adenin-Stammverbindung als aktivierbare Spezies zur gezielten Modifikation von Nucleinsäuren eignet, jedoch eine im Vergleich zu 2'-Desoxyadenosin höhere hydrolytische Stabilität an der N-glycosylischen Bindung besitzt.

2'-Desoxytubercidin (1) wurde zuerst an der 4-Aminogruppe mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen. Wir wählten, wie schon beim Tubercidin,¹¹ den Benzoylrest und stellten Verbindung 3a durch Reaktion von 1 mit Benzoylchlorid nach einem Verfahren dar, bei dem die glyconischen Hydroxylgruppen temporär durch Trimethylsilylreste geschützt werden.¹⁸ Die benzoyletrierte Verbindung 3a, die wir in 92% Ausbeute gewannen, ist im Gegensatz zu N⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin hydrolysestabil und wird nicht ohne weiteres an der N-glycosylischen Bindung gespalten. Die Benzoyleylierung an der 4-Aminogruppe ergibt sich aus der Hochfeldverschiebung der C-4-, C-4a- und C-5-NMR-Signale (Tabelle 1). Allerdings ist nicht nur die glycosylische, sondern auch die Amidbindung zum Benzoylrest wesentlich stabiler als beim entsprechend geschützten 2'-Desoxyadenosin. Da die grosse Stabilität der Amidbindung von 3a Probleme bei der Abspaltung in der Oligonucleotid-Synthese bringen kann, haben wir die Hydrolysegeschwindigkeit gemessen und mit der von N⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin verglichen.

Die Kinetik der Debenzoyleylierung von 3a und die vergleichsweise bestimmte von N⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin wurden UV-spektroskopisch bei 303 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge weisen Edukt und Produkt erhebliche Unterschiede in der Extinktion auf (λ_{\max} von 1: 270 nm; λ_{\max} von 3a: 303 nm). Die Reaktion, in 0,2 N NaOH-Methanol (1:1, v/v) bei 25° durchgeführt, ergab für 3a eine Halbwertszeit von 269 min; der Wert für die entsprechende Purin-Verbindung lag bei 169 min (Lit.:¹⁹ 224 min bei 22°). Eine Erhöhung der Natronlauge-Konzentration erhöhte die Hydrolysegeschwindigkeit von N⁶-Benzoyl-

2'-desoxyadenosin nur geringfügig, von 3a praktisch nicht. Dies unterstreicht, dass sowohl 3a als auch das Purinnucleosid unter diesen Bedingungen gemäss 1. Ordnung debenzoyliert werden. Die erschwerte Reaktion von 3a gegenüber der entsprechenden Purin-Verbindung lässt auch bei der Debenzoyleylierung im Oligonucleotidverband längere Abspaltzeiten für die Schutzgruppe vermuten. Wir konnten bei verlängerter Einwirkung von schwachen Basen wie Ammoniak die vollständige Debenzoyleylierung nachweisen.

Die 4,4'-Dimethoxytritylierung von 3a führte unter Standardbedingungen in 76% Ausbeute zu 3b. Die Tritylierungsposition wird sowohl durch das Fehlen des 5'-OH-Triplets im ¹H-NMR-Spektrum als auch durch die Hochfeldverschiebung des 5'-C-Signals um 2 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum angezeigt (Tabelle 1). Bei der "flash"-Chromatographie²⁰ erwies es sich als günstig, ein Dichlormethan-Aceton-Gemisch statt eines mit Triethylamin schwach basisch gemachten Laufmittels von Chloroform-Methanol zu verwenden. So verhindert die Abwesenheit von Methanol die bei der Säulenchromatographie beobachtete Abspaltung des 4,4'-Dimethoxytritylrestes vollständig. Die zuvor am ungeschützten Nucleosid 1 durchgeführte Dimethoxytritylierung zu 3c erbrachte stets geringere Ausbeuten an der 5'-geschützten Komponente, was wir auf die geringere Effektivität der chromatographischen Trennung zurückführen.

Umsetzung von 3b mit einer äquimolaren Menge an Chlordiisopropylaminomethoxyphosphan¹⁶ in absol. Dichlormethan lieferte das Phosphoramidit 2, das ebenfalls durch "flash"-Chromatographie gereinigt wurde. Dies hat sich als günstig erwiesen, obgleich das Reaktionsgemisch aus der Phosphitylierung neben 2 eine geringe Spur an unumgesetztem 3b enthielt. Der Verzicht auf eine vollständige Umsetzung verhinderte, dass unumgesetztes Phosphitylierungsreagenz hydrolysiert.²¹ Das dabei entstehende Reaktionsprodukt ist dann viel schwerer aus dem Reaktionsansatz abzutrennen als eine Spur des Nucleosids 3b. Das farblose amorphe Phosphoramidit 2 zeigt im ³¹P-NMR-Spektrum bei 149.92 und 150.03 ppm die Signale der Diastereomeren ohne Verunreinigung durch hydrolysiertes Phosphitylierungsreagenz.

Röntgenstrukturdaten²² zeigten bei 2'-Desoxytubercidin und 2'-Desoxyadenosin eine ähnliche Konformation im glyconischen Rest. Allerdings ist die N-glycosylische Bindung stark verkürzt. Um nachzuweisen, welchen Einfluss dies auf die Eigenschaften von Oligonucleotiden hat, wurde das Dinucleosidmonophosphat 4a synthetisiert. Zur Synthese von 2'-Desoxytubercidylyl(3' → 5')-2'-desoxytubercidin (4a) (d(TupTu)) ist die Darstellung einer 3'-terminal geschützten Komponente erforderlich. Als 3'-terminale Schutzgruppe wählten wir den von Ogilvie²³ in die Oligonucleotid-Synthese eingeführten *tert*-Butyldimethylsilylrest.²⁴ Silylierung von 3b mit *tert*-Butylchloridimethylsilan führt zu 3d, das chromatographisch gereinigt und analysenrein erhalten wurde, wobei das ¹³C-NMR-Spektrum die Silylierung der glyconischen Komponente anzeigt (Tabelle 1). Die selektive Abspaltung des 4,4'-Dimethoxytritylrestes erfolgte mit Zinkbromid in Nitromethan. Wie sich herausstellte, lagen die Ausbeuten stets höher, wenn 3d nicht isoliert, sondern direkt der Abspaltung des 4,4'-Dimethoxytritylrestes unterzogen wurde.

Tabelle 1. ^{13}C -NMR-Verschiebungen (δ -Werte, relativ zu Tetramethylsilan) von 2'-Desoxytubercidin-Derivaten in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$

Verbindung	C-2	C-4	C-4a	C-5	C-6	C-7a	C-1'	C-4'	C-2'	C-3'	C-5'	C=O	CH_3O	$(\text{CH}_3)_2$	$(\text{CH}_3)_3\text{C}$	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	
1	151.3	157.3	102.8	99.4	121.4	149.5	87.1	83.2	39.6	71.0	62.0						
Tubercidin ²⁶	151.5	157.5	103.1	99.5	122.3	149.4	87.6	85.8	73.7	70.8	61.9						
3a	151.0	152.0	109.4	103.1	124.3	150.0	87.3	82.9	39.7	70.9	61.9	165.7					
3b	150.9	152.0	109.3	103.0	123.9	149.9	85.2	82.7	39.4	70.6	63.9	165.6	54.8				
3c*	151.7	156.5	103.8	98.0	121.7	150.5	85.6	83.5	40.8	70.8	63.7		54.7	-5.02	25.4	17.3	
3d	150.9	152.0	109.3	103.1	124.2	150.0	85.6	85.0	39.0	72.0	63.2	165.4	54.8	-5.26			
3e	150.9	152.0	109.3	103.1	124.2	150.0	87.3	82.7	40.0	72.6	61.4	165.5		-5.02	25.5	17.4	
																	-5.07

 *In CDCl_3 -Triethylamin.

Die Kondensation von **2** mit **3e** erfolgte in Tetrahydrofuran durch Aktivierung von **2** mit frisch sublimiertem Tetrazol. Verbindung **2** wurde dabei im 1.5fachen Überschuss eingesetzt; ein geringerer Überschuss senkte die Ausbeute an Kondensationsprodukt. Es erwies sich als günstig, eine Mischung aus **2**, **3e** und Tetrazol unter Argon-Atmosphäre vorzulegen und auf das Gemisch absolutes Tetrahydrofuran zu destillieren, wobei die Komponenten in Lösung gehen. Das intermediär gebildete Phosphit wird mit Iod-Wasser-Lutidin zum Phosphat **4b** oxidiert. Extraktion und "flash"-Chromatographie führen zu farblosem amorphem **4b**, das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt bei δ 0.01 und -0.05 ppm Signale eines Diastereomerenmischens. Das ^1H -NMR-Spektrum bestätigt die Anwesenheit von zwei Tubercidylyl-Resten sowie aller Schutzgruppen. Das UV-Maximum von 304 nm (CH_2Cl_2) zeigt das intakte Vorliegen der benzylierten Aglycone an.

Die Sequenz der Abspaltung der Schutzgruppen wurde mit der Demethylierung von **4b** begonnen, die, in Thiophenol-Triethylamin-Dioxan durchgeführt, **4c** als einziges Reaktionsprodukt ergab. Desilylierung mit Tetrabutylammoniumfluorid lieferte **4d**, von dem der Tritylrest mit Trichloressigsäure unter Bildung von **4e** entfernt wurden. Bis zu dieser Stufe wiesen die UV-Spektren der Reaktionsprodukte UV-Absorptionsmaxima bei 304 nm auf. Die Behandlung von **4e** mit konz. Ammoniak-Methanol (1:1) bei 50° über 24 h führte zur vollständigen Abspaltung der Benzoylreste, was durch eine Verschiebung des UV-Maximums auf 270 nm angezeigt wird. Zur Reinigung wird **4a** an DEAE-Sephadex A-25 chromatographiert.

Das Dinucleosidmonophosphat **4a** wird durch Schlangengift-Phosphodiesterase in 2'-Desoxytubercidin (**1**) und 2'-Desoxytubercidin-5'-O-monophosphat (**3f**) als die einzigen Reaktionsprodukte gespalten. Im Gegensatz zur Ausgangsverbindung **4a** (DC (Kieselgel RP 18, M): $R_f = 0.33$) weisen **1** und **3f** Mobilitäten von 0.50 bzw. 0.74 im gleichen Chromatographiesystem auf, die mit authentischen Proben übereinstimmen. Das ^1H -NMR-Spektrum von **4a** liefert im Bereich von δ 6.20–8.10 ppm jeweils zwei separierte Signale für die Protonen 2-H, 5-H, 6-H und 1'-H.—Da das 6-Proton des 3'-terminalen Restes von **4a** in die Anisotropiesphäre des Phosphatrestes gelangt und dadurch eine Tieffeldverschiebung bewirkt wird, kann wie beim ApA das Tieffeldsignal dem 3'-terminalen Rest, das Hochfeldsignal dem 5'-terminalen Rest zugeordnet werden. Die Zuordnung der 2-H- und 5-H-Signale kann so nicht ohne weiteres vorgenommen werden. Im ^1H -NMR-Spektrum von **4a** wird ein 1'-H-Signal zum Pseudotriplett, das andere hingegen zum doppelten Duplett aufgespalten. Dieses unterschiedliche Verhalten des 1'-H-Signals haben wir immer dann beobachtet, wenn die 3'-Hydroxylgruppe des 2'-Desoxytubercidins substituiert wurde. Überträgt man diese Befunde auf **4a**, so kann das Hochfeldsignal der 1'-Protonen dem 5'-terminalen, das Tieffeldsignal dem 3'-terminalen Rest zugeordnet werden. Obgleich die Lage der UV-Absorptionsmaxima von **4a** und **1** übereinstimmt (270 nm), besitzt das Dinucleosidmonophosphat eine geringere Extinktion. Die durch Basenstacking hervorgerufene Hypochromizität kann bestimmt werden, indem man **4a** in 0.1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8.5 mit Schlangengift-Phosphodiesterase spaltet und die Reaktion UV-

spektroskopisch verfolgt. Nach Korrektur der durch das Enzym verursachten UV-Absorption ergibt sich für **4a** eine Hypochromizität von 11.6%. Sie liegt damit nur geringfügig niedriger als die von 2'-Desoxyadenosyl(3' → 5')-2'-desoxyadenosin (d(ApA)) (12.1%).

Beim Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeit von **4a** mit d(ApA) durch die Einzelstrang-spezifische Nuclease S₁ stellten wir fest, dass die Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-Verbindung etwa fünfmal schneller hydrolysiert wird als die entsprechende Purin-Verbindung. Somit unterscheidet das Enzym nicht nur zwischen einzel- und doppelsträngigen Strukturen, sondern reagiert auch empfindlich auf die isostere Modifikation der Nucleobase. Die grossen Unterschiede in den Hydrolysegeschwindigkeiten der isosteren Dinucleosidmonophosphate führen wir auf die unterschiedliche π -Elektronenverteilung der Aglycone in d(TupTu) und d(ApA) zurück, die sich im Oligomerenverband mit unterschiedlicher Geometrie überlappen; ein Zustand, der offenbar vom Enzym erkannt werden kann.

EXPERIMENTELLER TEIL

Schmelzpunkte (nicht korrigiert): Linström-Apparat (Wagner & Munz, München). Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller, Göttingen. ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren: Bruker-WM-250-Spektrometer; δ -Werte relativ zu Tetramethylsilan (¹H und ¹³C in [D₆]DMSO; interner Standard), zu 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-D₄-Natriumsalz (¹H in D₂O; interner Standard) und zu 85proz. Orthophosphorsäure (³¹P; externer Standard); positives Vorzeichen bedeutet Tieffeldverschiebung zum jeweiligen Standard. UV-Spektren: Kontron Uvicon-810- und Shimadzu 210-A-Spektrometer. Dünnschichtchromatographie (DC): Kieselgelplatten SIL G-25 UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren), Kieselgelplatten RP 18F_{254S} (Merck, Darmstadt), PEI-Cellulose-Platten Polygram CEL 300 PEI/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren). Präparative Säulenchromatographie: Kieselgel 60H (Merck, Darmstadt) mit Arbeitsdruck 0.6 bar (N₂); Amberlite XAD-4-Harz (Serva, Heidelberg), Celluloseaustauscher DE-52 (Carbonatform, Whatman, England).

Laufmittel: A (CH₂Cl₂-CH₃OH, 9:1), B (CH₂Cl₂-Aceton, 98:2), C (CH₂Cl₂-Aceton, 95:5), D (CH₂Cl₂-Aceton, 3:1), E (CH₂Cl₂-Aceton, 7:3), F (CH₂Cl₂-CH₃OH-Triethylamin, 97.5:2:0.5), G (CH₂Cl₂-CH₃OH-Triethylamin, 93.5:6:0.5), H (CH₂Cl₂-CH₃OH-Triethylamin, 89.5:10:0.5), I (CH₂Cl₂-CH₃OH-Triethylamin, 69.5:30:0.5), J (CH₂Cl₂-Ethylacetat-Triethylamin, 45:45:10), K (CH₂Cl₂-Triethylamin, 99.5:0.5), L (0.25 M wäss. LiCl), M (H₂O-CH₃OH, 3:7). 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat Puffer (TBK) wurde durch Einleiten von CO₂ in eine Mischung von 4280 ml H₂O und 720 ml Triethylamin bis zum Erreichen von pH 7 hergestellt. Pyridin wurde mit Toluolsulfoclorid unter Rückfluss gekocht, abdestilliert und danach über CaH₂ unter Argon erneut destilliert. Die Absolutierung von Tetrahydrofuran erfolgte durch Kochen mit Kalium-Natrium-Legierung (5:1) in Gegenwart von Benzoylbiphenyl unter Argon. Schlängengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1.) und Nuclease S₁ (EC 3.1.30.1.) wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

4 - Benzoylamino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**3a**)

4 - Amino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl - 7H - pyrrolo[2,3 - d]pyrimidin (2' - Desoxytubercidin) (**1**); 1.0 g, 4.0 mmol)¹⁰ in 10 ml absol. Pyridin werden 2 h mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorosilan bei Raumtemp gerührt und anschliessend mit 520 μ l (4.1 mmol) frisch destilliertem

Benzoylchlorid versetzt. Nach 2 h Rühren werden unter Eiskühlung 4 ml Wasser, nach weiteren 5 min 8 ml 25proz. Ammoniak hinzugegeben und die Reaktionsmischung nach 30 min zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und zweimal mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird zur Trockne eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und an Amberlite XAD-4 (Säule 30 × 1.5 cm) adsorbiert. Waschen mit 1 l Wasser und Elution mit 2 l Wasser-MeOH (3:2) trennt **3a** ab. Nach Einengen löst man in wenig Methanol und kristallisiert durch Zugabe von Wasser in farblosen Nadeln: 1.32 g (92%). (Auslassen des Chromatographieschrittes führt zu Ausbeuteverlust) Schmp. 112°. DC (Kieselgel, A): R_f = 0.4. UV (MeOH): λ_{\max} 224, 303 nm (ϵ = 26800, 9300); λ_{\min} 263 nm (ϵ = 6100). ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ 2.27 (m, 2'-H_b), 2.54 (m, 2'-H_a), 3.56 (m, 5'-CH₂), 3.86 (m, 4'-H), 4.39 (t, 3'-H, J = 2.7 Hz), 5.15 (t, 5'-OH, J = 7.5 Hz), 5.50 (d, 3'-OH, J = 3.8 Hz), 6.67 (t, 1'-H, J = 3.9 Hz und 9.5 Hz), 6.68 (d, 5-H, J = 3.9 Hz), 7.51-8.08 (m, H-aromat.), 7.72 (d, 6-H, J = 3.7 Hz), 8.60 (s, 2-H), 11.16 ppm (NH, breit). (C₁₈H₁₈N₄O₆ (354.4): Ber.: C, 61.00; H, 5.13; N, 15.81. Gef.: C, 61.04; H, 5.47; N, 15.61%.)

4 - Benzoylamino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl) - 5' - O - dimethoxytrityl) - 7H - pyrrolo[2,3 - d]pyrimidin (**3b**)

Verbindung **3a** 500 mg (1.42 mmol) in 10 ml absol. Pyridin werden mit 0.5 ml N-Ethylidiisopropylamin versetzt und nach Zugabe von 720 mg (2.14 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylchloromethan 3 h bei Raumtemp gerührt, danach mit 10 ml 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und zweimal mit 15 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und der Rückstand an Kieselgel 60H (Säule 7 × 4 cm) mit 800 ml Solvens D und anschliessend mit 1 l Solvens E der "flash"-Chromatographie²⁰ unterworfen. Der nach Abdampfen der Hauptzone erhaltene Rückstand liefert nach mehrmaligem Einengen mit Aceton 710 mg (76%) farblose amorphe Substanz. DC (Kieselgel, A): R_f = 0.5. UV (MeOH): λ_{\max} 226, 276, 282, 302 nm (ϵ = 33900, 7700, 7800, 7200); λ_{\min} 218, 262, 278, 291 nm (ϵ = 30700, 6300, 7600, 6800). ¹H-NMR ([D₆]DMSO) δ 2.35, 2.65 (2m, 2'-H_a und 2'-H_b), 3.27 (m, 5'-CH₂), 3.72 (s, 2 OCH₃), 3.98 (m, 4'-H), 4.41 (m, 3'-H), 5.38 (d, J = 4.2 Hz, 3'-OH), 6.69 (dd, J = 6.5 Hz und 3.8 Hz, 1'-H), 6.67 (d, J = 3.8 Hz, 5-H), 6.81-8.08 (m, 19 arom. H und 6-H), 8.59 (s, 2-H), 11.16 ppm (s, NH). (C₃₉H₃₆N₄O₆ (656.8): Ber.: C, 71.32; H, 5.54; N, 8.53. Gef.: C, 71.76; H, 5.65; N, 8.29%.)

4 - Amino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl) - 5' - O - (4,4' - dimethoxytrityl) - 7H - pyrrolo[2,3 - d]pyrimidin (**3c**)

Verbindung **1** (250 mg, 1 mmol) in 5 ml absol. Pyridin werden mit 200 μ l N-Ethylidiisopropylamin und 510 mg (1.5 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylchloromethan versetzt und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 10 ml 5proz. NaHCO₃-Lsg. wird zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen werden eingengt und durch "flash"-Chromatographie an Kieselgel 60H (Säule 6 × 4 cm) mit 1 l Solvens K und 1 l Solvens F gewaschen und danach mit 1 l Solvens G eluiert. Nach Einengen und anschliessender Lyophilisation aus Dioxan 240 mg (43%) farbloses amorphes **3c**. DC (Kieselgel, A): R_f = 0.30. UV (MeOH): λ_{\max} 230 (Sh), 272 nm (ϵ = 23800, 13100); λ_{\min} 252 nm (ϵ = 9200). ¹H-NMR ([D₆]DMSO) δ 2.24, 2.57 (2m, 2'-H_a und 2'-H_b), 3.15 (m, 5'-CH₂), 3.73 (s, 2 OCH₃), 3.93 (m, 4'-H), 4.37 (m, 3'-H), 5.33 (d, J = 4.3 Hz, 3'-OH), 6.55 (dd, J = 3.6 Hz und 6.7 Hz, 1'-H), 6.58 (d, J = 3.5 Hz, 5-H), 6.82-7.39 (m, arom. H), 7.20 (d, J = 3.5 Hz, 6-H), 8.06 ppm (s, 2-H). (C₃₂H₃₂N₄O₃ (552.7): Ber.: C, 69.54; H, 5.85; N, 10.14. Gef.: C, 69.29; H, 5.97; N, 9.99%.)

4 - Benzoylamino - 3' - O - (tert - butyldimethylsilyl) - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl) - 5' - O - (4,4' - dimethoxytrityl) - 7H - pyrrolo[2,3 - d]pyrimidin (**3d**)

Verbindung **3b** (400 mg, 0.61 mmol), Imidazol (182 mg, 2.68 mmol) und tert-Butylchloridimethylsilan (202 mg, 1.34 mmol) werden in 8 ml absol. Dimethylformamid

gelöst und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Man giesst die Reaktionslösung in 30 ml 5proz. wässr. Natriumhydrogencarbonat und extrahiert mehrfach mit Dichlormethan. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, eingengt und der Rückstand an einer 9×2.5 cm Säule (Kieselgel 60H, Solvens C) der "flash"-Chromatographie unterworfen. Aus der eingeeengten Hauptzone erhält man 334 mg (71%) farbloses amorphes **3d**. DC (Kieselgel, B): $R_f = 0.70$. UV (MeOH): λ_{max} 234, 282, 301 nm ($\epsilon = 42100, 10400, 9600$); λ_{min} 217, 262, 291 nm ($\epsilon = 37000, 8400, 9200$). $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$) δ 0.01, 0.05 [2s, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$], 0.83 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 2.36, 2.71 (2m, 2'-H_a und 2'-H_b), 3.15 (m, 5'-CH₂), 3.71 (s, OCH₃), 3.88 (m, 4'-H), 4.60 (m, 3'-H), 6.66 (dd, J = 3.5 Hz und 6.5 Hz, 1'-H), 6.68 (d, J = 3.5 Hz, 5-H), 7.59 (d, J = 3.7 Hz, 6-H), 6.82–8.08 (arom. H), 8.58 (s, 2-H), 11.16 ppm (s, NH). ($\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}$ (771.1): Ber.: C, 70.09; H, 6.55; N, 7.27. Gef.: C, 70.15; H, 6.58; N, 7.20%.)

4 - Benzylamino - 3' - O - (tert - butyldimethylsilyl) - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl - 7H - pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**3e**).

Verbindung **3b** (500 mg, 0.76 mmol) in 5 ml absol. Dimethylformamid werden mit Imidazol (228 mg, 3.35 mmol) und 253 mg (1.68 mmol) *tert*-Butylchloridimethylsilylan versetzt und 10 h bei Raumtemp gerührt danach in 40 ml 5proz. wässr. Natriumhydrogencarbonat gegeben und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird abgedampft und der Rückstand in 20 ml Nitromethan aufgenommen. Die mit 5 g wasserfreiem Zinkbromid versetzte Lösung wird 1.5 h gerührt und in 50 ml 5proz. wässr. Natriumhydrogencarbonat gegossen. Mehrfache Extraktion mit Dichlormethan führt nach Vereinigung der organischen Phasen, Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen zu einem amorphen Rückstand. Dieser wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und an Kieselgel 60H (Säule 9×4 cm, Solvens B) chromatographiert. Nach Abdampfen der Hauptfraktion wird der Rückstand durch mehrfaches Nachdampfen mit Aceton aufgeschäumt. 296 mg (84%) farbloses amorphes **3e**. DC (Kieselgel, B): $R_f = 0.20$. UV (MeOH): λ_{max} 224, 235 (Sh), 302 nm ($\epsilon = 27400, 23800, 9800$); λ_{min} 262 nm ($\epsilon = 6400$). $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$) δ 0.13 [s, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$], 0.91 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 2.25, 2.65 (2m, 2'-H_a und 2'-H_b), 3.55 (m, 5'-CH₂), 3.85 (m, 4'-H), 4.57 (m, 3'-H), 5.04 (t, J = 5.4 Hz, 5'-OH), 6.66 (dd, J = 6.5 Hz und 3.5 Hz, 1'-H), 6.69 (d, J = 3.5 Hz, 5-H), 7.51–8.09 (m, arom. H), 7.72 (d, J = 3.8 Hz, 6-H), 8.61 (s, 2-H), 11.14 ppm (s, NH). ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$ (468.7): Ber.: C, 61.50; H, 6.89; N, 11.96. Gef.: C, 61.43; H, 6.68; N, 11.73%.)

4 - Amino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl) - 7H - pyrrolo[2,3-d]pyrimidin - 5' - monophosphat, Triethylammoniumsalz (**3f**)

Verbindung **1** (50 mg, 0.2 mmol) in 2 ml Triethylphosphat werden bei 4° mit 37 μl (0.4 mmol) POCl_3 versetzt und 5 h bei gleicher Temp. aufbewahrt. Die Lösung wird mit 1 ml zerstoßenem Eis versetzt, mit 1 M TBK neutralisiert und *i. Hochvak.* eingedampft. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und an DE-52-Cellulose (Säule 45×3.5 cm) adsorbiert. Nach Waschen mit Wasser wird mit 1000 ml 0.5 M TBK/1000 ml Wasser (linearer Gradient) eluiert und die bei 0.3 M TBK abgetrennte Hauptzone eingengt. Nachdampfen mit Wasser und Lyophilisation liefert 1900 A_{270} -Einheiten (78%) amorphes farbloses **3f**. DC (PEI-Cellulose, L: $R_f = 0.30$. UV (H_2O): λ_{max} 270 nm ($\epsilon = 12200$). $^{31}\text{P-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$, pH 8.0, 0.1 M EDTA) δ 4.42. 1 Mol Phosphat/Mol **3f**.¹²

4 - Benzylamino - 7 - (2 - desoxy - β - D - erythro - pentofuranosyl) - 3' - O - (diisopropylmethylphosphoramidito) - 5' - O - (4,4' - dimethoxytrityl) - 7H - pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**2**)

Verbindung **3b** (500 mg, 0.76 mmol) in 4 ml absol. Dichlormethan werden zuerst mit 294 μl (2.28 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin und danach mit 150 μl (0.76 mmol) Chlordiisopropylaminomethoxyphosphan¹⁰ bei Raumtemp unter Rühren versetzt (Argon-Atmosphäre). Nach 2 h werden

10 ml wässr. Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und es wird mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die über Na_2SO_4 getrocknete organische Phase wird eingengt und der Rückstand der "flash"-Chromatographie an Kieselgel 60H (Säule 7×2.5 cm, Solvens J)²³ unterzogen. Nach Einengen der Hauptzone und Abdampfen mit Aceton erhält man **2** als farblose amorphe Substanz in 72% (450 mg) Ausbeute. DC (Kieselgel, J): $R_f = 0.90$. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 150.03, 149.92 ppm.

*N*⁴ - Benzoyl - 5' - O - (4,4' - dimethoxytrityl) - P - methyl - 2' - desoxytubercidylyl(3' → 5') - *N*⁴ - benzoyl - 3' - O - (tert - butyldimethylsilyl) - 2' - desoxytubercidin (**4b**)

Verbindung **2** (157 mg, 192 μmol) 60 mg (128 μmol) **3e** und 40.3 mg (576 μmol) Tetrazol werden unter Argon-Atmosphäre 3 h in absol. Tetrahydrofuran bei Raumtemp gerührt. Anschliessend wird eine Lösung von 100 mg (385 μmol) Iod in 1 ml Tetrahydrofuran-Lutidin-Wasser (4:3:1) zugegeben und weitere 30 min gerührt. Man entfärbt mit Natriumsulfat, versetzt mit 20 ml Dichlormethan-Wasser (1:1) und schüttelt beide Phasen intensiv. Nach Abtrennen der organischen Phase, Extraktion mit Dichlormethan und Filtration wird eingengt. Nach zweimaligem Einengen mit Toluol wird der Rückstand mittels "flash"-Chromatographie an Kieselgel 60H (Säule 6×2.5 cm, Solvens D) gereinigt. Aus der Hauptzone erhält man nach Eindampfen 103 mg (72%) farbloses amorphes **4b**. DC (Kieselgel, D): $R_f = 0.70$. UV (CH_2Cl_2): λ_{max} 304 nm ($\epsilon = 19900$). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0.42 [s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 0.94 [s, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$], 3.77 (s, CH_2O), 6.88 (d, J = 3.7 Hz, 5-H), 6.96 (d, J = 3.7 Hz, 6-H), 6.91 (d, J = 3.8 Hz, 5-H), 7.12 (d, J = 3.8 Hz, 6-H), 8.39, 8.49 (2s, 2-H), 8.86 (breit, NH). $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 0.01, -0.05 ppm. ($\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{O}_9\text{PSi}$ \times 2 H_2O (1239.5): Ber.: C, 62.01; H, 5.95; N, 9.04. Gef.: C, 62.01; H, 6.04; N, 8.96%.)

2' - Desoxytubercidylyl(3' → 5') - 2' - desoxytubercidin, Triethylammoniumsalz (**4a**)

Verbindung **4b** (60 mg, 48 μmol) werden mit 3 ml einer Mischung von Thiophenol-Triethylamin-Dioxan (1:1:2, v/v/v) versetzt und 5 h bei Raumtemp gerührt. Nach Eindampfen *i. Vak.* wird der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel 60H (Säule 6×3 cm, Solvens G) chromatographiert. Nach Abtrennen und Eindampfen der Hauptzone erhält man einen farblosen Rückstand **4c** (DC (Kieselgel, G): $R_f = 0.40$; UV (CDCl_3): λ_{max} 304 nm). Man nimmt in 5 ml Tetrahydrofuran-Pyridin (3:5) auf, versetzt mit 1.0 g Tetrabutylammoniumfluorid und rührt 2 h bei Raumtemp, wobei **4d** als einheitliches Produkt entsteht (DC (Kieselgel, I): $R_f = 0.80$). Die Lösung wird *i. Vak.* eingedampft, in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit 20 ml einer 5proz. Lösung von Trichloressigsäure in Dichlormethan versetzt. Nach 2 h wird die intensiv rot gefärbte Lösung mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt und **4e** aus der wässrigen Phase durch Eindampfen gewonnen (DC (Kieselgel, H): $R_f = 0.14$; UV (MeOH): λ_{max} 304 nm). Den Rückstand behält man 24 h in 40 ml Methanol-25proz. Ammoniak (1:1) bei 50° auf, dampft ab, nimmt in 20 ml Wasser auf und chromatographiert an DEAE-Sephadex A-25 (Säule 15×1.5 cm). Nach Waschen mit 1 l Wasser wird mit 800 ml 0.3 M TBK-H₂O (linearer Gradient von 0–0.3 M) eluiert. Die bei 0.11 M TBK abgetrennte Hauptzone wird eingengt und mit Wasser mehrmals nachgedampft. Man erhält **4a** als Triethylammoniumsalz in 25proz. Ausbeute. DC (RP₁₈, M): $R_f = 0.33$. UV (CH_3OH): λ_{max} 270 nm. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ 6.22 (dd, J = 5.6 Hz und 8.7 Hz, 1'-H), 6.41 (dd, J = 3.5 Hz und 7.0 Hz, 1'-H), 6.44 (d, J = 3.5 Hz, 5-H), 6.57 (d, J = 3.6 Hz, 5-H), 7.21 (d, J = 3.7 Hz, 6-H), 7.42 (d, J = 3.7 Hz, 6-H), 7.95 (s, 2-H), 8.01 ppm (s, 2-H).

Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten von d(ApA) und d(TupTu) (**4a**) durch Nuclease S₁

Das Dinucleosidmonophosphat (0.5 A_{260} -Einheiten d(ApA) bzw. 0.5 A_{270} -Einheiten d(TupTu)) wird in 1 ml 0.03 M Natriumacetatpuffer pH 4.5, der 0.1 M Natriumchlorid und 1

mM Zinksulfat enthält, gelöst und in einer 1-cm-Quarzküvette im Photometer auf 37° temperiert. Man startet die Reaktion durch Zugabe von Nuclease S₁ (10⁴ units) und registriert die Zunahme der Extinktion bei 260 nm [d(ApA)] bzw. 270 nm [d(TupTu)].

Danksagung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen sowie Frl. M. Anders für kinetische Messungen.

LITERATUR

- ¹ F. Seela, H.-D. Winkeler, J. Ott, Q.-H. Tran-Thi, D. Hasselmann, D. Franzen und W. Bussmann, *Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications*, Hrsg. J. L. Rideout, D. W. Henry und L. M. Beacham III, S. 181. Academic, New York (1983).
- ² A. Bloch, R. J. Leonard und C. A. Nichol, *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 10 (1967).
- ³ R. J. Suhadolnik, *Nucleosides as Biological Probes*. Wiley-Interscience, New York (1979).
- ⁴ H. E. Renis, H. G. Johnson und B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* **22**, 1126 (1962).
- ⁵ M. Ikehara und T. Fukui, *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 512 (1974).
- ⁶ F. Seela, J. Ott und D. Franzen, *Nucleic Acids Res.* **10**, 1389 (1982).
- ^{7a} R. J. Suhadolnik, S. I. Finkel und B. M. Chassy, *J. Biol. Chem.* **243**, 3532 (1968); ^b B. M. Chassy und R. J. Suhadolnik, *Ibid.* **243**, 3538 (1968).
- ^{8a} S. A. Brinkley, A. Lewis, W. J. Critz, L. L. Witt, L. B. Townsend und R. L. Blakeley, *Biochemistry* **17**, 2350 (1978); ^b L. L. Witt, T. Yap und R. L. Blakeley, *Adv. Enzyme Regul.* **17**, 157 (1978).
- ^{9a} M. J. Robins und W. H. Muhs, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 269 (1976); ^b M. J. Robins, R. A. Jones und R. Mengel, *Can. J. Chem.* **55**, 1251 (1977).
- ¹⁰ F. Seela und A. Kehne, *Liebigs Annln Chem.* 876 (1983).
- ¹¹ F. Seela, J. Ott und E. Hissmann, *Ibid.* 692 (1984).
- ¹² F. Seela, Q.-H. Tran-Thi und D. Franzen, *Biochemistry* **21**, 4338 (1982).
- ¹³ B. Singer und M. Kröger, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **23**, 151 (1979).
- ¹⁴ N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto und S. Nishimura, *Biochemistry* **19**, 395 (1980).
- ¹⁵ S. L. Beaucage und M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **22**, 1859 (1981).
- ¹⁶ L. J. McBride und M. H. Caruthers, *Ibid.* **24**, 245 (1983).
- ¹⁷ F. Seela, H. Driller, A. Kehne, S. Menkhoff, J. Ott, H. Steker und H.-D. Winkeler, *Chemical Synthesis in Molecular Biology*, Hrsg. H. Blöcker, R. Frank und H.-J. Fritz. Verlag Chemie, Weinheim (1985).
- ¹⁸ G. S. Ti, B. L. Gaffney und R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1316 (1982).
- ¹⁹ H. Köster, K. Kulikowski, T. Liese, W. Heikens und V. Kohli, *Tetrahedron* **37**, 363 (1981).
- ²⁰ W. C. Still, M. Kahn und A. Mitra, *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978).
- ²¹ F. Seela und H. Driller, *Nucleic Acids Res.* **13**, 911 (1985).
- ²² W. Sängler, A. Kehne und F. Seela, in Vorbereitung.
- ²³ K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* **51**, 3799 (1973).
- ²⁴ W. Köhler, W. Schlosser, G. Charubala und W. Pfeleiderer, *Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides*, Hrsg. R. E. Harmon, R. K. Robins und L. B. Townsend, S. 347. Academic, New York (1978).
- ²⁵ T. Dörper und E. L. Winnacker, *Nucleic Acids Res.* **11**, 2575 (1983).
- ²⁶ F. Seela, E. Hissmann und J. Ott, *Liebigs Annln Chem.* 1169 (1983).