

119. Nucleotide. IX¹⁾. Synthese und Eigenschaften von 1-(2'-Desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphaten

von Ramamurthy Charubala und Wolfgang Pfeleiderer

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz, Postfach 7733, D-7750 Konstanz

(29.XII.78)

Nucleotides. IX. Synthesis and properties of 1-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphates

Summary

The synthesis of various 1-(2'-deoxy- α -[and β -]D-ribofuranosyl)-lumazine-3'-monophosphates **25-30** starting from the corresponding pteridine nucleosides **1-6** is described. Monomethoxytritylation in 5'-position to **7-12**, phosphorylation by cyanoethylphosphate to **13-18**, and deprotection by acid and base treatment afforded the lumazine nucleotides **25-30** in good overall yield. The various reaction products have been characterized by physical means, such as UV. spectra, pK-values and their chromatographical and electrophoretical behaviour. Enzymatic dephosphorylations by alkaline phosphatase led to the starting material **1-6** with a 3-4 times slower hydrolysis rate in comparison to Tp.

1. Einleitung. - Die strukturelle Analogie zwischen Thymidin- und Lumazin-N(1)- β -D-2'-desoxyribofuranosiden [2] lässt letzteren Verbindungstyp zu einem interessanten, modifizierten Nucleinsäurebaustein werden, dessen chemische und physikalische Eigenschaften Gegenstand früherer Untersuchungen waren. Im Rahmen systematischer Studien an Pteridin-nucleotiden interessierten wir uns auch für die Lumazin-N(1)-nucleosid-3'-monophosphate, die sich bezüglich ihres chemischen, physikalischen und enzymatischen Verhaltens an die entsprechenden 5'-Monophosphate [3] anschliessen sollten. Als Ausgangssubstanzen für die Herstellung der 3'-Monophosphate dienen das 1-(α -) (**1**) 1-(β -2'-Desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin (**2**) sowie deren 6,7-Dimethyl- (**3** bzw. **4**) und 6,7-Diphenyl-Derivate (**5** bzw. **6**) [2].

2. Syntheseweg. - Im ersten Schritt der Synthese wurden die Lumazin-2'-desoxynucleoside **1-6** in 5'-Stellung durch Umsetzung mit *p*-Monomethoxytritylchlorid [4] in Pyridin zu **7-12** geschützt und dann der Phosphorylierung durch β -Cyanoäthylphosphat [5] in Pyridin/Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) [6] [7] bzw. *p*-Tosyltriaxolid (TT) [8] unterworfen. Das 5'-*O*-*p*-Monomethoxytrityl-lumazin-nucleosid wurde dabei erst nach kurzer Aktivierung des β -Cyanoäthylphosphates

¹⁾ Teil 8: [1].

Tabelle 1. *Physikalische Daten von Lumazin-2'-desoxy-ribofuranosiden und ihren 3'-Monophosphaten*

| pK-Werte in H ₂ O 20° | UV.-Absorptionsspektren | | | | pH- Wert | Rf-Werte | | | | | Elektro- phorese*) Borat pH 9 | |
|--|-------------------------|---------------|--------|------|-------------|----------------|------|--------------------|------|------|-------------------------------------|------|
| | λ_{\max} (nm) | lg ϵ | | | | Kieselgel A | B | Cellulose C D E | | | | |
| 7 | 232 | 317 | 4,49 | | 3,88 | MeOH | 0,19 | | | | | |
| 8 | 232 | 317 | 4,40 | | 3,80 | MeOH | 0,23 | | | | | |
| 9 | 230 | 324 | 4,43 | | 3,93 | MeOH | 0,40 | | | | | |
| 10 | 231 | 324 | 4,44 | | 3,96 | MeOH | 0,53 | | | | | |
| 11 | 227 | 273 | 357 | 4,59 | 4,24 | 4,11 | MeOH | 0,51 | | | | |
| 12 | 227 | 273 | 359 | 4,59 | 4,22 | 4,11 | MeOH | 0,69 | | | | |
| 13 | 230 | 316 | 4,42 | | 3,82 | MeOH | 0,24 | | | | | |
| 14 | 231 | 317 | 4,36 | | 3,73 | MeOH | 0,20 | | | | | |
| 15 | 225 | 325 | 4,69 | | 3,96 | MeOH | 0,47 | | | | | |
| 16 | 231 | 325 | 4,49 | | 3,97 | MeOH | 0,38 | | | | | |
| 17 | 227 | 274 | 359 | 4,56 | 4,21 | 4,10 | MeOH | 0,61 | | | | |
| 18 | 227 | 274 | 359 | 4,59 | 4,24 | 4,11 | MeOH | 0,58 | | | | |
| 19 | 228 | 314 | 4,16 | | 3,88 | 1,0 | | | | | | |
| | 228 | 315 | 4,13 | | 3,87 | 7,0 | 0,06 | 0,14 | 0,30 | 0,46 | 0,66 | |
| | 237 | 274 | 324 | 4,19 | 3,60 | 3,86 | 13,0 | | | | | |
| 20 | 228 | 316 | 4,14 | | 3,88 | 1,0 | | | | | | |
| | 228 | 317 | 4,14 | | 3,87 | 7,0 | 0,05 | 0,13 | 0,26 | 0,53 | 0,58 | |
| | 238 | 273 | 325 | 4,22 | 3,62 | 3,86 | 13,0 | | | | | |
| 21 | 222 | [248] | 324 | 4,55 | [3,97] | 3,97 | 1,0 | | | | | |
| | 222 | [248] | 324 | 4,55 | [3,99] | 3,97 | 7,0 | 0,17 | 0,19 | 0,44 | 0,57 | 0,56 |
| | | | 330 | | | 4,02 | 13,0 | | | | | |
| 22 | [245] | 324 | [4,04] | 4,02 | 1,0 | | | | | | | |
| | [245] | 324 | [4,05] | 4,03 | 7,0 | | 0,12 | 0,16 | 0,39 | 0,63 | 0,49 | |
| | | 331 | | 4,05 | 13,0 | | | | | | | |

[] = Schulter; *) = bezogen auf pT = 1,00.

[9] [10] zugegeben und dann 12–24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Hydrolyse des Reaktionsgemisches mit Eiswasser, Chloroformextraktion und chromatographische Auftrennung auf präparativen Kieselgelplatten in Systemen wie Aceton/0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 19:1 oder Aceton/Methanol/0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 81:15:4. Auf diese Weise lassen sich die 5'-O-Monomethoxytrityl- α - bzw. β -2'-desoxyribofuranosyllumazin-3'- β -cyanoäthylphosphate (**13–18**) in Form ihrer stabilen Ammoniumsalze in Ausbeuten von 50–65% isolieren.

Die Detritylierung von **13–18** zu **19–24** erfolgte in bekannter Weise mit 80proz. Essigsäure bei Raumtemperatur, bis im Chromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr zu erkennen war. Es wurde dann mehrfach mit Äthanol behandelt, in Wasser aufgenommen und nach Chloroformextraktion die wässrige Phase zu den chromatographisch reinen Produkten **19–24**, die in Ausbeuten zwischen 75 und 93% gewonnen wurden, lyophilisiert. Im letzten Schritt der Synthese wurde der Cyanoäthyl-Rest durch Einwirkung von 25proz. Ammoniak bei Raumtemperatur eliminiert, was nach 1–2 Tagen beendet war und die 1- α - und 1- β -2'-Desoxy-D-

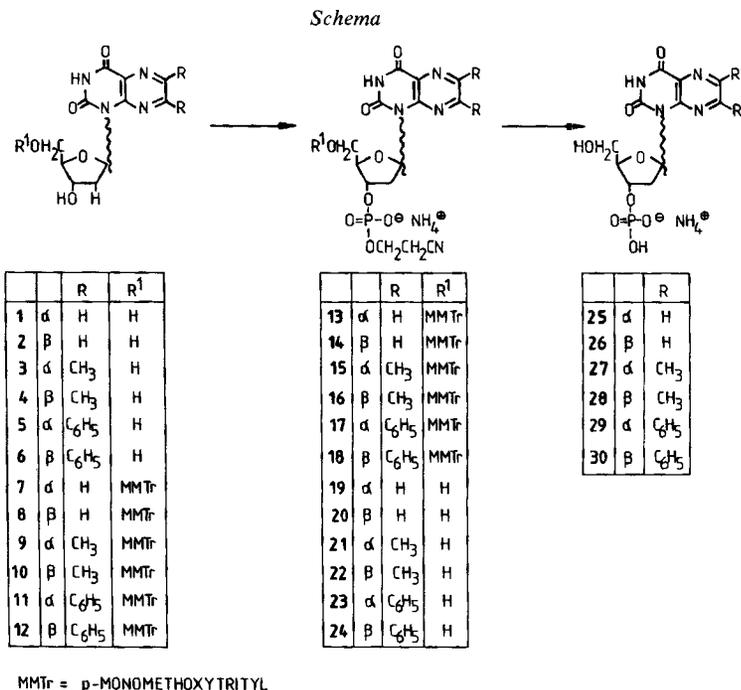
Tabelle 1. (Fortsetzung)

| pK-Werte in H ₂ O 20° | UV.-Absorptionsspektren | | | | | | pH- Wert | Rf-Werte | | | | | Elektro- phorese*) Borat pH 9 |
|--|-------------------------|-----|---------------|------|------|--------|-------------|-----------|------|-----------|------|------|-------------------------------------|
| | λ_{\max} (nm) | | lg ϵ | | | | | Kieselgel | | Cellulose | | | |
| | | | | | | | A | B | C | D | E | | |
| 23 | 225 | 273 | 359 | 4,41 | 4,18 | 4,12 | 1,0 | | | | | | |
| | 225 | 273 | 358 | 4,41 | 4,19 | 4,12 | 7,0 | 0,28 | 0,38 | 0,73 | 0,72 | 0,40 | |
| | | 264 | 359 | | 4,31 | 4,19 | 13,0 | | | | | | |
| 24 | 223 | 274 | 359 | 4,42 | 4,18 | 4,12 | 1,0 | | | | | | |
| | 223 | 274 | 359 | 4,42 | 4,16 | 4,13 | 7,0 | 0,82 | 0,45 | 0,71 | 0,74 | 0,37 | |
| | | 265 | 361 | | 4,26 | 4,16 | 13,0 | | | | | | |
| 25 | 7,84 | 228 | | 316 | 4,10 | | 3,84 | 1,0 | | | | | |
| | | 228 | | 317 | 4,12 | | 3,84 | 7,0 | 0,10 | 0,09 | 0,14 | 1,05 | |
| | | 237 | 271 | 329 | 4,15 | 3,66 | 3,80 | 13,0 | | | | | |
| 26 | 7,92 | 229 | | 316 | 4,11 | | 3,84 | 1,0 | | | | | |
| | | 230 | | 317 | 4,10 | | 3,84 | 7,0 | 0,13 | 0,03 | 0,17 | 1,20 | |
| | | 238 | 273 | 327 | 4,20 | 3,72 | 3,86 | 13,0 | | | | | |
| 27 | 9,00 | 208 | [245] | 324 | 4,26 | [3,99] | 3,97 | 1,0 | | | | | |
| | | 208 | [245] | 324 | 4,25 | [3,96] | 3,96 | 7,0 | 0,14 | 0,10 | 0,22 | 0,85 | |
| | | 240 | [272] | 331 | 4,19 | [3,59] | 3,99 | 13,0 | | | | | |
| 28 | 9,24 | 229 | [244] | 323 | 4,09 | [3,99] | 3,97 | 1,0 | | | | | |
| | | 229 | [244] | 324 | 4,09 | [4,02] | 3,97 | 7,0 | 0,14 | 0,11 | 0,23 | 0,98 | |
| | | 241 | [272] | 331 | 4,24 | [3,56] | 4,01 | 13,0 | | | | | |
| 29 | 9,15 | 222 | 274 | 358 | 4,43 | 4,18 | 4,12 | 1,0 | | | | | |
| | | 222 | 274 | 359 | 4,44 | 4,19 | 4,13 | 7,0 | 0,37 | 0,33 | 0,50 | 0,48 | |
| | | 224 | 265 | 361 | 4,40 | 4,29 | 4,16 | 13,0 | | | | | |
| 30 | 9,33 | 222 | 274 | 359 | 4,41 | 4,15 | 4,12 | 1,0 | | | | | |
| | | 221 | 274 | 359 | 4,41 | 4,16 | 4,12 | 7,0 | 0,38 | 0,33 | 0,51 | 0,60 | |
| | | 224 | 265 | 361 | 4,34 | 4,29 | 4,18 | 13,0 | | | | | |

ribofuranosyllumazin-3'-monophosphate **25-30** als Ammoniumsalze in hohen Ausbeuten von 77-94% lieferte.

3. Physikalische Eigenschaften. - Die Charakterisierung der verschiedenen Reaktionsprodukte haben wir jeweils nach chromatographischer Prüfung auf Reinheit auf spektroskopischem Wege vorgenommen. Die lg ϵ -Werte der UV.-Spektren basieren bei den 5'-O-Monomethoxytrityl-Verbindungen **7-12** auf den elementaranalytisch bestimmten Summenformeln, während für die verschiedenen 3'-Phosphate aufgrund der problematischen Elementaranalytik die quantitative Phosphatbestimmung [11][12] als Bezug gewählt wurde.

Beim Vergleich der UV.-Spektren der Lumazin-N(1)-2'-desoxyriboside **1-6** mit ihren entsprechenden 3'-Monophosphaten **25-30** findet man die erwartete grosse Übereinstimmung sowohl bezüglich der Lage der Absorptionsbanden als auch der Extinktionswerte. Lediglich bei den auf spektrophotometrischem Wege [13] bestimmten pK_a-Werten von **25-30** werden die strukturellen Unterschiede sichtbar, indem die Acidität des H-Atoms am N(3) des Aglykons im Vergleich



zum entsprechenden Nucleosid bei **25** und **26** etwas zunimmt, während sie bei **27-30** leicht abgeschwächt ist. Dies dürfte auf Feldeffekte durch die Phosphat-Gruppe zurückzuführen sein, die sich zusätzlich in den 1-(α -2'-Desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-phosphaten **25**, **27** und **29** aufgrund der günstigeren sterischen Verhältnisse säureverstärkend bemerkbar machen.

Bei den Papierelektrophoresen in Borat-Puffer pH 9 fällt auf, dass bei den 3'-Monophosphaten die Mobilität zwischen α - und β -2'-Desoxyribosid-Reihe erstaunlich grosse Unterschiede, die für eine Identifizierung geeignet sind, aufweist, wogegen die Dünnschichtchromatogramme auf Cellulose in verschiedenen Systemen (*Tab. 1*) sehr ähnliche Werte liefern, die keine oder nur eine unvollkommene Unterscheidung zulassen.

Tabelle 2. CD.-Spektren von 1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphaten bei pH 7,0

| Verbindung | λ_{\max} (nm) | | | | | \odot | | | | |
|------------|-----------------------|-----|-----|-------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 25 | 215 | 237 | 253 | 260 | 310 | - 14650 | + 8280 | + 200 | + 350 | - 2300 |
| 26 | 222 | 240 | 255 | 263 | 315 | + 20100 | - 9800 | - 1000 | - 2300 | + 7000 |
| 27 | 216 | 238 | | [265] | 315 | - 23150 | + 11100 | | [+ 900] | - 1000 |
| 28 | 220 | 240 | 255 | 265 | 317 | + 35000 | - 15000 | - 2000 | - 3500 | + 5950 |
| 29 | 215 | 235 | 241 | 285 | 315 | - 28800 | - 4400 | - 5300 | + 5300 | - 1250 |
| 30 | 216 | 230 | 244 | 282 | [330] | + 36200 | - 2050 | + 12450 | - 11000 | - 400 |

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen der α - und β -Nucleotid-Reihe bilden die chiroptischen Eigenschaften der Verbindungen 25-30, die sich bei den Anomerenpaaren 25 und 26 bzw. 27 und 28 in gegenläufigen CD.-Spektren äussern. Die 6,7-Diphenyl-lumazin-nucleotide 29 und 30 zeigen diese Spektrencharakteristik lediglich im kurzwelligen Bereich, wogegen sich die langwelligen Cotton-Effekte bei 360 nm in Grösse und Vorzeichen stark annähern, bedingt wohl durch eine verstärkte intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem Kohlenhydratteil und der 7-Phenyl-Gruppe im Aglykon.

4. Enzymatische Spaltungen. - Abschliessend haben wir die Substrataktivität der 1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphate 25-30 gegenüber alkalischer Phosphatase aus *E. coli* bei pH 8,92 und 37° im Vergleich zum Thymidin-3'-monophosphat untersucht und dabei festgestellt, dass für die Lumazinnucleotide die 3 bis 4fache Inkubationsdauer erforderlich ist, um eine quantitative Phosphat-hydrolyse zu erreichen. Während Tp unter den gewählten Bedingungen bereits nach 1 Std. gespalten ist, wird bei 25-30 erst nach 3-4 Std. Reaktionsdauer anhand dünn-schichtchromatographischer Verfolgung auf Cellulose im System Äthanol/1N Ammoniumacetat 7:3 das Ende der Umsetzung festgestellt. Die Enzym-spaltungen verlaufen in allen Fällen recht einheitlich zu den entsprechenden Lumazin-nucleosiden 1-6, wobei allerdings im Chromatogramm aufgrund der starken Fluoreszenzen der Pteridine allgemein jeweils auch Spuren der freien Aglykone [14] zu erkennen sind.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Hilfe und Frau *M. Bischler* für die Bestimmung verschiedener physikalischer Daten.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem Cary-Recording-Spektrometer, Modell 15 bzw. 118 der Fa. *Appl. Physics* aufgenommen. Für die Dünnschichtelektrophorese stand ein *Camag*-Gerät zur Verfügung. Die chromatographischen Untersuchungen erfolgten auf Dünnschichtfolien Kieselgel F 1500 LS 254 bzw. Cellulose F 1440 LS 254 der Fa. *Schleicher & Schüll* in den Systemen A): Chloroform/Methanol 9:1; B): Chloroform/Methanol 7:3; C): 1-Butanol/5N Essigsäure 2:1; D): 2-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 7:1:2 und E): Äthanol/1N Ammoniumacetat 7:3. Die schichtchromatographischen Trennungen wurden auf präparativen Kieselgellplatten (40×20×0.2 cm) mit Kieselgel PF₂₅₄ der Fa. *Merck* als Trägermaterial durchgeführt und für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Korngrösse 0.05-0.2 mm, *Merck*) verwendet. Zum Trocknen der Substanzen bei Raum- bzw. erhöhter Temp. über P₂O₅ im Vakuum diente das Gerät TO-50 der Fa. *Büchi*. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Substanzen: Abs. Pyridin wurde durch Kochen unter Rückfluss mit *p*-Toluolsulfochlorid, Destillation, Behandlung mit Calciumhydrid und Aufbewahrung über Molekularsieb hergestellt. Alkalische Phosphatase aus *E. coli* (E.C.3.1.3.1) stammt von *Boehringer, Mannheim/West Germany*.

2. *Phosphatbestimmung.* Es wurden mit der Molybdänblau-Reaktion jeweils 3 Parallelbestimmungen in der Weise durchgeführt, dass zunächst 0,2-0,3 μ mol in 220 μ l eines Säuregemisches aus 66proz. HClO₄-Lösung, konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure 180:45:65 (v/v) durch 3-4 Std. Erhitzen im Sandbad bei 140° aufgeschlossen wurde. Man versetzt mit 0,5 ml Wasser, hält 30 Min. bei 100°, kühlt auf RT. und setzt dann 0,5 ml einer 2,5proz. Ammoniummolybdat-Lösung sowie 0,25 ml Reduktionslösung (hergestellt aus 0,125 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure, 7,31 g Natrium-

hydrogensulfit und 0,25 g Natriumsulfit in 50 ml Wasser gelöst und nach 12 Std. filtriert) zu. Es wird auf 5 ml aufgefüllt und 10 Min. nach Zugabe der Reduktionslösung bei 660 nm gegen Wasser als Referenz gemessen.

3. *Allgemeine Herstellungsverfahren für die 1-(5'-O-p-Monomethoxytrityl-2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazine 7–12.* Die Lösung von 1 mmol 1-(2'-Desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin (1–6) und 1,3–1,5 mmol *p*-Monomethoxytritylchlorid in 4–6 ml abs. Pyridin wird unter Feuchtigkeitsausschluss gut verschlossen 12–18 Std. bei RT. gerührt, bis sich chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachweisen lässt. Der Fortgang der Tritylierung lässt sich dabei an der charakteristischen Gelbfärbung beim Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure leicht nachweisen. Nach beendeter Reaktion setzt man 0,5 ml Methanol zu, rührt noch 2 Std. und dampft zur Trockne ein. Der Rückstand wird mehrmals mit je 5 ml Chloroform extrahiert, der Extrakt 2mal mit 4 ml Wasser gewaschen und dann die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Man engt auf ein kleines Volumen ein, gibt auf eine Kieselgelsäule (35×2 cm), chromatographiert zunächst mit Chloroform und ändert dann das System in Chloroform/Methanol 99:1, wobei das Monomethoxytrityl-Derivat in einheitlicher Fraktion eluiert wird. Man engt die chromatographisch auf Reinheit geprüfte Hauptfraktion ein und kristallisiert bzw. fällt den Rückstand aus Chloroform/Petroläther um. Die Substanzen wurden bei 80–100° in der Trockenpistole getrocknet.

3.1. *1-(5'-O-p-Monomethoxytrityl-2'-desoxy-α-D-ribofuranosyl)-lumazin (7).* Der Eluierungsrückstand wird aus Chloroform/Hexan umkristallisiert und ergibt 0,422 g (80%) farblose Kristalle, Smp. 155–158°.

C₃₁H₂₈N₄O₆ · 0,5 H₂O (561,6) Ber. C 66,30 H 5,20 N 9,97% Gef. C 66,63 H 5,30 N 9,81%

3.2. *1-(5'-O-p-Monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin (8).* Der Extraktionsrückstand wird in wenig Benzol gelöst und unter starkem Rühren in Cyclohexan langsam eingetropft, wobei 0,485 g (88%) amorpher Feststoff erhalten wird, der ab 127° sintert und bei 145–146° schmilzt.

C₃₁H₂₈N₄O₆ (552,6) Ber. C 67,38 H 5,11 N 10,14% Gef. C 67,26 H 5,13 N 10,12%

3.3. *6,7-Dimethyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-α-D-ribofuranosyl)-lumazin (9).* Der Rückstand wird mit Hexan behandelt, scharf abgesaugt und ergibt nach Trocknen bei 60° 0,78 g (90%) farblosen Feststoff vom Smp. 188–191°.

C₃₃H₃₂N₄O₆ (580,7) Ber. C 68,26 H 5,56 N 9,65% Gef. C 68,33 H 5,44 N 9,68%

3.4. *6,7-Dimethyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin (10).* Nach Einengen wird das Eluat in wenig Chloroform gelöst und unter intensivem Rühren in Hexan langsam eingetropft. Es scheiden sich 0,51 g (88%) farbloser Feststoff vom Smp. 147–149° ab.

C₃₃H₃₂N₄O₆ (580,7) Ber. C 68,26 H 5,56 N 9,65% Gef. C 68,07 H 5,57 N 9,26%

3.5. *6,7-Diphenyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-α-D-ribofuranosyl)-lumazin (11).* Der Eluierungsrückstand wird in wenig Chloroform gelöst und unter Rühren in Hexan eingetropft, wobei sich 0,622 g (88%) gelblicher Feststoff vom Smp. 147–148° abscheidet.

C₄₃H₃₆N₄O₆ · 0,5 H₂O (713,8) Ber. C 72,35 H 5,22 N 7,89% Gef. C 72,36 H 5,02 N 7,97%

3.6. *6,7-Diphenyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin (12).* Der Rückstand wird aus Essigester/Hexan 4:1 umkristallisiert und ergibt 0,59 g (84%) gelbliche Kristalle vom Smp. 173–175°.

C₄₃H₃₆N₄O₆ (704,8) Ber. C 73,28 H 5,11 N 7,95% Gef. C 73,52 H 5,04 N 7,84%

4. *Allgemeine Herstellungsverfahren für die Ammonium-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphate 13–18.* Die Lösung von 2 mmol frisch bereitetem Pyridinium-β-cyanoäthylphosphat [15] in 4 ml abs. Pyridin wird mit 4 mmol Triisopropylbenzolsulfonchlorid (TPS) [6] bzw. 8 mmol *p*-Tosyltriazolid (TT) [8] versetzt und 30 Min. bei RT. unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Man setzt dann 1 mmol 1-(5'-O-p-Monomethoxytrityl-2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin zu und rührt 12–24 Std. bei RT. im Dunkeln weiter, bis chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachzuweisen ist. Es wird dann mit Eis hydrolysiert, unter Eiskühlung 1–2 Std. gerührt und anschliessend 4mal mit je 10 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden 2mal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur

Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst, auf präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) aufgetragen und in Aceton/0,1M Ammoniumhydrogencarbonat 19:1 (**13**, **14**, **15** und **16**) bzw. Aceton/Methanol/0,1M Ammoniumhydrogencarbonat 81:15:4 (**17** und **18**) entwickelt. Die Produktbande wird mit Chloroform/Methanol 1:1 eluiert und anschliessend eingedampft. Der Rückstand wird erneut in wenig Chloroform/Methanol gelöst und entweder unter Rühren in abs. Äther eingetropfelt oder direkt lyophilisiert. Der abgeschiedene Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und in der Trockenpistole i. V. über P₂O₅ bei 60–80° getrocknet.

4.1. *Ammonium-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (13)*. Ausbeute: 0,42 g (60%) farbloser Feststoff, der sich ab 141–142° zersetzt.

4.2. *Ammonium-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (14)*. Ausbeute: 0,45 g (64%) farbloser Feststoff, der ab 108° sintert und bei 131–134° schmilzt.

4.3. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (15)*. Die Phosphorylierungen mit TPS bzw. TT lieferten gleiche Ausbeuten: 0,325 g (56%) farbloser Feststoff, der sich ab 160° unter Braunfärbung zersetzt.

4.4. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (16)*. Die Phosphorylierungen mit TPS bzw. TT lieferten Ausbeuten von 48% (0,356 g) bzw. 50% (0,37 g) eines amorphen Feststoffes, der ab 140° sintert und sich bei 168–171° zersetzt.

4.5. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (17)*. Ausbeute: 0,43 g (50%) gelblicher Feststoff, der sich ab 149° unter Dunkel-färbung zersetzt.

4.6. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (18)*. Die Phosphorylierungen mit TPS bzw. TT ergaben Ausbeuten von 47% (0,4 g) bzw. 55% (0,47 g) an gelblichem Feststoff, der bei 156–160° dunkel wird und sich dann zersetzt.

5. *Allgemeine Herstellungsverfahren für die Ammonium-1-(2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphate 19–24*. Man rührt 0,1 mmol Ammonium-1-(5'-O-p-monomethoxytrityl-2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (**13–19**) in 1 ml 80proz. Essigsäure im Dunkeln bei RT. solange, bis dünnschichtchromatographisch das Ausgangsprodukt nur noch in Spuren erkennbar bzw. ganz verschwunden ist. Man dampft mehrmals mit Äthanol i.RV. ein, nimmt in Wasser auf, wäscht 3mal mit je 4 ml Chloroform und lyophilisiert dann die wässrige Phase zu einem amorphen Feststoff.

5.1. *Ammonium-1-(2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (19)*. Ausbeute: 0,041 g (90%) farbloser Feststoff, der sich ab 162° zersetzt.

5.2. *Ammonium-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (20)*. Ausbeute: 0,042 g (93%) farbloser Feststoff, der sich ab 158° zersetzt.

5.3. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (21)*. Ausbeute: 0,039 g (87%) farbloser Feststoff, der sich ab 176° braun färbt und bei 200° zersetzt.

5.4. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (22)*. Ausbeute: 0,038 g (86%) farbloser Feststoff, der sich bei 182–186° unter Dunkelfärbung zersetzt.

5.5. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (23)*. Ausbeute: 0,053 g (94%) gelblicher Feststoff, der sich bei 186–188° unter Braunfärbung zersetzt.

5.6. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-β'-cyanoäthyl)phosphat (24)*. Ausbeute: 0,043 g (75%) gelblicher Feststoff, der sich bei 157–160° unter Dunkelfärbung zersetzt.

6. *Allgemeine Herstellungsverfahren der Ammonium-1-(2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphate 25–30*. Man rührt 0,1 mmol Ammonium-1-(2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (**19–24**) in 0,5 ml konz. Ammoniak bei RT. im Dunkeln 24–48 Std., bis chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachweisbar ist. Man engt dann zur Trockne ein, nimmt in Wasser auf, wäscht mehrfach mit wenig Chloroform und lyophilisiert dann die wässrige Phase zu einem amorphen Feststoff. Für die enzymatischen Versuche wird weiter auf Papier im System Äthanol/1M Ammoniumacetat 7:3 chromatographiert, mit Wasser eluiert und schliesslich lyophilisiert.

6.1. *Ammonium-1-(2'-desoxy-a-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (25)*. Ausbeute: 0,031 g (77%) farbloses Kristallpulver, das sich ab 175° braun färbt und ab 205° zersetzt.

6.2. *Ammonium-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (26)*. Ausbeute: 0,037 g (91%) farbloses Kristallpulver, das sich ab 200° zersetzt.

6.3. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy- α -D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (27)*. Ausbeute: 0,039 g (94%) farbloses Kristallpulver, das sich ab 185° braun färbt und zersetzt.

6.4. *Ammonium-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (28)*. Ausbeute: 0,039 g (94%) farbloses Kristallpulver, das ab 175° sintert und sich ab 195° braun färbt und zersetzt.

6.5. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(2'-desoxy- α -D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (29)*. Ausbeute: 0,046 g (84%) farbloses Kristallpulver, das sich ab 215° unter Dunkelfärbung zersetzt.

6.6. *Ammonium-6,7-diphenyl-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphat (30)*. Ausbeute: 0,047 g (85%) farbloses Kristallpulver, das ab 178° sintert und sich ab 183–186° zersetzt.

7. *Enzymatische Dephosphorylierung von 1-(2'-Desoxy-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-monophosphaten (25–30)*. Zur Lösung von ca. 2 OD Lumazin-3'-monophosphat in 40 μ l bidest. Wasser werden 5 μ l Tris-Puffer pH 8,92 und 4 μ l alkalische Phosphatase aus *E. coli* (0,04 mg Protein/ml) gegeben und dann bei 37° 24 Std. inkubiert. Durch papierchromatographische Verfolgung im System Äthanol/1M Ammoniumacetat 7:3 lässt sich erkennen, dass die Phosphathydrolyse in allen untersuchten Fällen nach 3–4 Std. beendet ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teil 8: *M. Hattori, K. Ienaga & W. Pfeleiderer*, Liebigs Ann. Chem. 1978, 1796.
- [2] *G. Ritzmann & W. Pfeleiderer*, Chem. Ber. 106, 1401 (1973).
- [3] *M. Hattori & W. Pfeleiderer*, Liebigs Ann. Chem. 1978, 1780.
- [4] *H. Schaller & H. G. Khorana*, J. Am. chem. Soc. 85, 3821 (1963).
- [5] *G. M. Tener*, J. Am. chem. Soc. 83, 159 (1961).
- [6] *R. Lohrmann & H. G. Khorana*, J. Am. chem. Soc. 88, 829 (1966).
- [7] *R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie*, J. Am. chem. Soc. 89, 4801 (1967).
- [8] *N. Katagiri, K. Itakura & S. A. Narang*, J. Am. chem. Soc. 97, 7332 (1975).
- [9] *R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie*, J. Am. chem. Soc. 91, 3350 (1969).
- [10] *R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie & P. S. Miller*, J. Am. chem. Soc. 91, 3360 (1969).
- [11] *R. O. Hurst & G. C. Becking*, Canad. J. biochem. Physiol. 41, 469 (1963).
- [12] *C. H. Fiske & Y. Subba Row*, J. biol. Chemistry 66, 375 (1925).
- [13] *A. Albert & E. P. Serjeant*, 'The Determination of Ionization Constants', S. 44, Chapman and Hall Ltd., London 1971.
- [14] Über die Glycosidspaltung im physiologischen pH-Bereich werden wir in einer späteren Arbeit berichten.
- [15] *W. Falk & Ch. Tamm*, Helv. 55, 1928 (1972).