

von Thymidin-5'-phosphorothioat (2)^[5] unter S-Alkylierung^[6] zu (3) umgesetzt. Der Grad der Beladung mit (2) hängt ab von der Reaktionszeit, der Temperatur und dem Mengenverhältnis der Reaktionspartner. Er liegt zwischen 0.083 und 0.41 mmol pro g Polymer. Optimal für Oligonucleotidsynthesen ist ein Beladungsgrad von 0.175 bis 0.27 mmol pro g Polymer. Nicht verbrauchte Chlor-methylgruppen werden mit 2 N Na-Methylat in wasserfreiem Pyridin (1:6) während 1 Std. bei Raumtemperatur veräthert.

Der schrittweise Aufbau der Oligonucleotidkette erfolgt durch Verknüpfung der freien 3'-OH-Gruppe mit einem 3- bis 5-fachen Überschuß an geschütztem 3'-O-Acetyl-desoxyribonucleosid-5'-phosphat in wasserfreiem Pyridin während 6 bis 8 Std. bei Raumtemperatur in Gegenwart von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TPSCI) als Kondensationsmittel (2.5-facher Überschuß bezogen auf die Phosphat-Komponente). Nach Abspaltung der 3'-O-Acetylgruppe mit 2 N Na-Methylat in wasserfreiem Pyridin (1:9) in 25 min bei Raumtemperatur kann der nächste Kondensationsschritt erfolgen.

Die Abspaltung des Oligonucleotids vom Polymeren gelingt mit Jod (10 mg/ml) in Pyridin/Wasser (3:1) während 20 Std. bei Raumtemperatur. Die Schutzgruppen bleiben dabei erhalten, und an C-5' des abgespaltenen Produktes steht die Gruppierung $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$. Nach dieser Methode wurden folgende Oligo-desoxyribonucleotide dargestellt und durch Papierchromatographie und enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase charakterisiert (die Ausbeuten beziehen sich auf die letzte Kondensationsstufe)^[7]:

(pdT) ₂	39%	(pdT) ₃	25%	(pdT) ₄	19%	(pdT) ₅	21%
pdTpdan ⁴ C	23%	pdTpdan ⁴ CpdT	18%				
pdTpdbz ⁶ A	21%	pdTpdbz ⁶ ApdT	25%				

Eingegangen am 2. Juni 1972 [Z 661]

[1] H. Hayatsu u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3182 (1966); F. Cramer u. H. Köster, Angew. Chem. 80, 488 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 473 (1968); L. R. Melby u. D. R. Strobach, J. Org. Chem. 34, 421 (1969); R. L. Letsinger u. V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5319 (1966); K. F. Yip u. K. C. Tsou, J. Amer. Chem. Soc. 93, 3272 (1971); T. Kusama u. H. Hayatsu, Chem. Pharm. Bull. 18, 319 (1970).

[2] A. Kumar u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 91, 2743 (1969).

[3] G. M. Blackburn, M. J. Brown u. M. R. Harris, J. Chem. Soc. C 1967, 2438; W. Freist u. F. Cramer, Angew. Chem. 82, 358 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 368 (1970).

[4] R. B. Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964).

[5] Modifiziert nach A. W. Murray u. M. R. Atkinson, Biochemistry 7, 4023 (1968).

[6] A. F. Cook, M. J. Holman, A. L. Nussbaum, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6479 (1969); A. F. Cook, J. Amer. Chem. Soc. 92, 190 (1970).

[7] Abkürzungen nach IUPAC-IUB, Eur. J. Biochem. 15, 203 (1970): pdT = Thymidin-5'-phosphat, pdan⁴C = N⁴-Anisoyl-desoxycytidin-5'-phosphat, pdbz⁶A = N⁶-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat.

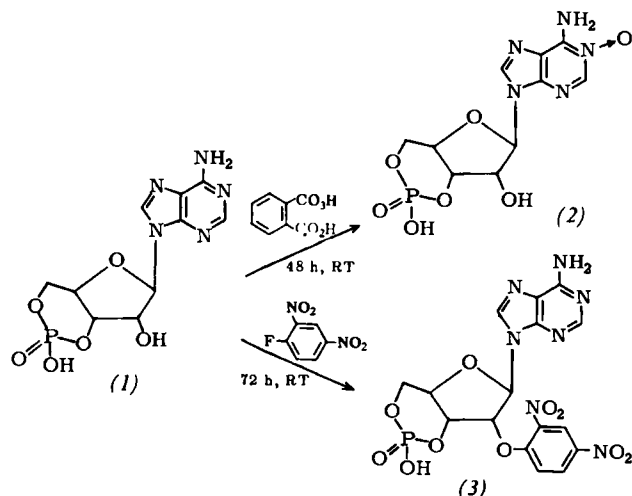
Neue Analoge des Adenosin-3',5'-cyclophosphats

Von Bernd Jastorff und Wolfgang Freist^[*]

Adenosin-3',5'-cyclophosphat (c-AMP) ist in den letzten Jahren als eines der wichtigsten niedermolekularen Regulationsmoleküle auf allen Stufen der Evolution erkannt

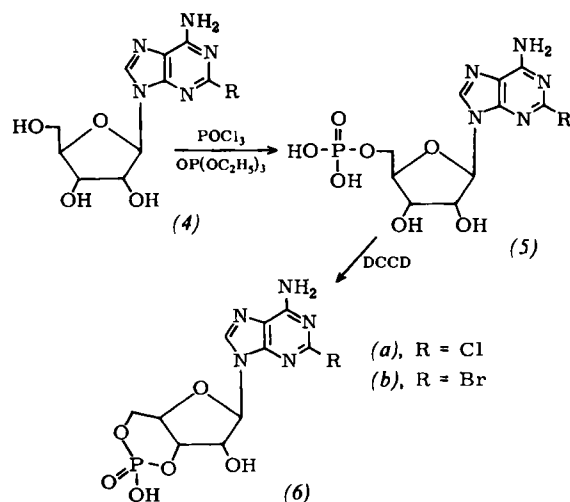
worden^[1]. In jüngster Zeit wurden zahlreiche Derivate des c-AMP synthetisiert^[2], um Substanzen mit spezifischer biologischer Aktivität zu erhalten und um die molekulare Wechselwirkung mit dem Rezeptor aufzuklären. Wir berichten hier über die Darstellung von Derivaten, in denen die Positionen N-1, C-2 und C-2' modifiziert sind.

Bei der Modifizierung von N-1 bzw. C-2' gingen wir von Adenosin-3',5'-cyclophosphorsäure (1) aus.



Aus Adenosin-3',5'-cyclophosphorsäure (1) erhält man das 1-N-Oxid (2) durch Oxidation (48 Std., Raumtemperatur) mit Monoperphthalsäure^[3] in Phosphatpuffer (pH = 7)^[4] mit 78% Ausbeute (papierchromatographische Isolierung).

Der Dinitrophenyläther (3) wurde durch Umsetzung (72 Std., Raumtemperatur) des Tri-n-butylammonium-



salzes von (1) mit 4 Äquivalenten 2,4-Dinitrofluorbenzol in DMF/Diisopropyläthylamin (Hünig Base) (40:1) mit 66% Ausbeute dargestellt und durch präparative Schichtchromatographie isoliert. Die C-2 substituierten Derivate (6) lassen sich nicht direkt aus c-AMP erhalten. Zu ihrer Darstellung wurden die 2-Halogennucleoside (4)^[5] mit POCl₃ in Triäthylphosphat phosphoryliert^[6] [Ausbeuten: (5a): 68%, (5b): 61%] und die 5'-Phosphate (5) mit Dicyclohexylcarbodiimid in wasserfreiem Pyridin/DMSO^[7] cyclisiert [Ausbeuten: (6a): 72%, (6b): 55%].

[*] Dr. B. Jastorff und Dr. W. Freist
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin,
Abteilung Chemie
34 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

Erste biologische Untersuchungen der dargestellten Analogen des c-AMP ergaben, daß alle Verbindungen von der Cyclophosphodiesterase aus Rinderherz (E. C. 3.1.4.1) gespalten werden. Allerdings ist die Spaltungsgeschwindigkeit bei (2) geringfügig, bei (3) auf die Hälfte und bei (6a) und (6b) erheblich vermindert. Die Reaktion des c-AMP mit dem Enzym wurde durch äquimolare Mengen der Analogen zu 12% (2), 50% (3), 55% (6a) bzw. 77% (6b) inhibiert. Alle Analogen aktivieren die Protein-Kinase aus Rindermuskel bei einer Konzentration von 10^{-5} M in etwa dem gleichen Maße wie c-AMP selbst. Die Kombination von verminderter Spaltungsgeschwindigkeit durch die Phosphodiesterase und unverminderter Fähigkeit zur Aktivierung der Kinase sollte in intakten Zellen zu potenziert physiologischer Wirkung führen.

Eingegangen am 2. Mai 1972 [Z 656]

- [1] J. P. Jost u. H. V. Rickenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 40, 741 (1971).
- [2] A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer u. H. Hettler, *J. Org. Chem.* 36, 3029 (1971); G. Michal, V. Nelböck u. G. Weimann, *Z. Anal. Chem.* 252, 189 (1970); G. H. Jones, H. P. Albrecht, N. P. Damodaran u. J. G. Moffatt, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 5510 (1970); K. Muneyama, R. J. Bauer, D. A. Shuman, R. K. Robins u. L. N. Simon, *Biochemistry* 10, 2390 (1971).
- [3] G. B. Payne, *J. Org. Chem.* 24, 1354 (1959).
- [4] F. Cramer u. K. Randerath, *Angew. Chem.* 70, 571 (1958).
- [5] J. A. Montgomery u. K. Hewson, *J. Heterocycl. Chem.* 1, 213 (1964).
- [6] M. Yoshikawa, T. Kato u. T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* 50, 5065 (1967).
- [7] R. H. Symons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 807 (1970).

Ein neuer Träger für die Festphasensynthese von Oligomeren^{[1](*)}

Von Hubert Köster und Stephan Geussenhainer^[*]

Nachteile der meisten zur Festphasensynthese nach Merrifield^[2] verwendeten Träger sind Porosität und Quellungsvermögen^[3]. Für die Synthese von Oligonucleotiden ergeben sich durch die Polarität der Phosphodiesterbindung weitere Schwierigkeiten bei Reaktionen in den Hohlräumen der unpolaren Trägersubstanz^[4].

Diese Nachteile sollten bei Verwendung eines möglichst unquellbaren, unporösen Trägers nicht auftreten. Hier können alle Reaktionen nur an der äußeren Oberfläche ablaufen. Um eine hinreichend große Oberfläche zu erhalten, müssen sehr kleine Kugeln dargestellt werden.

Es gelang uns, ein Perlpolymerisat aus Styrol und 20% Divinylbenzol darzustellen, das die erwünschten Eigenschaften hat. Es besteht aus Kugeln mit einem Durchmesser von ein bis zwei μm und kleiner und einer spezifischen Oberfläche von $8.1 \text{ m}^2/\text{g}$. Unter unseren Reaktionsbedingungen ist weder Quellung noch Porosität nachzuweisen.

Das Material läßt sich in einer Friedel-Crafts-Reaktion benzoyleieren. Die Benzophenongruppierungen werden mit *p*-Bromanisol in einer Grignard-Reaktion zum *p*-Methoxytriphenylmethanol umgesetzt und dieses in Acetanhydrid mit HCl-Gas in das Chlorid übergeführt. Die Bindung des nucleotidischen Materials geschieht über die 5'-OH-

Gruppe^[4]. Die Beladung erfolgt in der Größenordnung, die aufgrund der spezifischen Oberfläche zu erwarten ist: $6.6 \mu\text{mol}$ 3'-O-Acetyl-desoxythymidin und $6.1 \mu\text{mol}$ 3'-O-Acetyl-desoxythymidyl-(3'-5')-desoxythymidin werden pro Gramm Trägersubstanz gebunden. Diese Beladungen sind annähernd gleich groß, während man bei den bisher verwendeten makroporösen Perlpolymerisaten und Emulsionspolymerisaten ein Verhältnis von etwa 10:1 findet^[5, 6]. Die Abspaltung des nucleotidischen Materials vom Träger geschieht in 80-proz. Essigsäure bei 70°C in 10 Minuten. Die Abspaltung der 3'-O-Acetylgruppe gelingt in Dimethylformamid/Pyridin/1M Natriummethylat (5:4:1, v/v) in 2 Std. bei Raumtemperatur quantitativ.

Darstellung des Perlpolymerisates:

Zur Polymerisation wird ein 2-Liter-Glasgefäß mit einer NS-29-Hülse und einer seitlich angebrachten NS-14.5-Hülse verwendet. Der Durchmesser des Gefäßes beträgt 12 cm, die Höhe vom Boden bis zur Oberkante der NS-29-Hülse 26 cm. Durch die NS-29-Hülse führt die Welle eines Tornado-Emulsionsrührers (Fa. Emmendinger Maschinenbau), durch die NS-14.5-Hülse ein Einleitungsrohr, dessen ausgezogene Spitze direkt unter dem Rührblatt endet. – In das Polymerisationsgefäß wird 1 Liter einer 0.5-proz. wäßrigen Polyvinylalkohol-Lösung (Fa. Schuchardt) gegeben und die Apparatur mit Stickstoff gespült. Der Rührer wird auf 20000 U/min gestellt und das Monomergemisch (78 mmol Divinylbenzol, 312 mmol Styrol/Äthylstyrol, 4.68 mmol Azoisobutyronitril) langsam in den Kolben gegeben. Innerhalb einer Stunde steigt die Temperatur aufgrund der Reibungswärme des Rührers auf 50°C , und der Beginn der Polymerisation wird durch den Opak-Punkt gut sichtbar. Durch die Reaktionswärme steigt die Temperatur rasch auf 65 bis 68°C . Sie wird drei Stunden dort gehalten. Nach weiterem dreistündigem Rühren bei 75°C wird die Polymerisation abgebrochen. Das Gemisch wird durch ein feines Sieb (6400 Maschen pro cm^2) gegeben und bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mehrmals in heißem Wasser und zweimal in Methanol aufgeschlämmt und zentrifugiert. Nach dem Trocknen schließt sich eine mehrstündige Soxhlet-Extraktion mit Benzol an. Nach Trocknung im Hochvakuum: Auswaage $36.5 \text{ g} = 78.3\%$.

Eingegangen am 23. Mai 1972 [Z 657]

- [1] 9. Mitteilung über Festphasensynthese von Oligonucleotiden. – 8. Mitteilung: H. Köster, *Tetrahedron Lett.* 1972, 1535.
- [2] R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2249 (1963).
- [3] E. Wünsch, *Angew. Chem.* 83, 773 (1971); *Angew. Chem. internat. Edit.* 10, 786 (1971).
- [4] F. Cramer u. H. Köster, *Angew. Chem.* 80, 488 (1968); *Angew. Chem. internat. Edit.* 7, 473 (1968).
- [5] H. Köster, Dissertation, Braunschweig 1968.
- [6] S. Geussenhainer, Diplomarbeit, Hamburg 1972.

Photoisomerisierung von 2-[2-(*N*-Äthoxycarbonyl-*N*-allylamino)äthyl]benzaldehyd

Von Wolfgang Oppolzer und Kathrin Keller^[*]

In Zusammenhang mit Versuchen zur synthetischen Anwendung von intramolekularen *o*-Chinodimethan-Cyclo-

[*] Dr. H. Köster und Dipl.-Chem. S. Geussenhainer
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
2 Hamburg 13, Papendamm 6

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

[*] Dr. W. Oppolzer und Dipl.-Chem. K. Keller
Pharmazeutisch-Chemische Forschungslaboratorien,
SANDOZ AG
CH-4002 Basel (Schweiz)