

4c: Eine Lösung von **7c** (4.70 g, 10.0 mmol) in EtOH (200 mL) wurde bei 0 °C mit einer H₂SO₄(2 N)/EtOH-Lösung tropfenweise bis pH 3.1 (gegen Methylorange) angesäuert. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde der pH-Wert der Lösung vorsichtig durch Zugabe einer 2proz. KOH-Lösung in EtOH bis pH 5.5 erhöht und das Reaktionsgemisch eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen, mit H₂O (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und Flash-chromatographisch (mit Ammoniak vorbehandeltes Kieselgel, Ethylacetat/Petrolether 50/50) gereinigt. Man isolierte **4c** (4.24 g, 85%, *trans*:*cis* = 9:1) als zähes, farbloses Öl. *trans*-**4c**: *R*_f = 0.62 (50% Ethylacetat/Petrolether 50/50); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.32–7.22 (m, 10 H, ArH), 4.92 (d, *J* = 15.0 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.88 (d, *J* = 14.9 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.50 (s, 1 H, CHOEt), 4.12 (d, *J* = 15.0 Hz, 2 H, CH₂Ph), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 3.50–3.10 (m, 3 H, CH₂S, OCH₂), 3.07 (s, 2 H, SCH₂C(O)), 2.75–2.25 (m, 6 H, CH₂CO₂CH₃, CH₂C(O), CH₂S), 1.85 (Quintett, *J* = 7.5 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂), 1.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH₂CH₃); IR (CHCl₃): ν̄ = 1725, 1700 cm⁻¹.

2c: Ein Gemisch aus **4c** (249 mg, 0.500 mmol) und Ethyl(trimethylsilyl)acetat (189 µL, 1.05 mmol) in THF (1 mL) wurde tropfenweise bei -78 °C in 20 min mit TBAF (150 µL einer 0.1 M Lösung in THF, 15 µmol) versetzt. Nach 20 min Rühren bei -78 °C und 18 h Rühren bei 25 °C, wurde das Gemisch eingengt und der Rückstand in CH₂Cl₂ (2 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde auf -78 °C gekühlt, tropfenweise mit TMSOTf (135 µL, 0.750 mmol) versetzt und das Gemisch 1 h bei -78 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter, wässriger NH₄Cl-Lösung (5 mL) hydrolysiert und mit CH₂Cl₂ (50 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit H₂O (40 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, eingengt und durch Flashchromatographie (Ethylacetat/Petrolether 80/20) gereinigt. Man erhielt das Imidazolidinon **2c** (175 mg, 78%) als 3:2-Isomerenmisch. Beide Isomere konnten in reiner Form durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan erhalten werden.

(4*R*)-**2c**: *R*_f = 0.65 (Ethylacetat/Petrolether 60/40); Schmp. 101.5–102.5 °C; [α]_D²⁵ = -10.7 (c = 0.2 in CHCl₃); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.32–7.22 (m, 10 H, ArH), 4.78 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.57 (d, *J* = 15.0 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.22 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.05 (d, *J* = 15.0 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.04–4.02 (m, 2 H, H-6a, H-3a), 3.65 (s, 3 H, CH₃), 3.59 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, H-4), 2.82–2.71 (m, 2 H, H-6), 2.56 (dt, *J* = 17.5, 7.5 Hz, 1 H, CH₂C(O)), 2.25 (dt, *J* = 1.7, 7.5 Hz, 2 H, CH₂C(O)), 1.95 (dt, *J* = 17.5, 7.5 Hz, 1 H, CH₂C(O)), 1.78 (Quintett, *J* = 7.5 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂); IR (CHCl₃): ν̄ = 1725, 1700, 1680 cm⁻¹; HR-MS (EI, 70 eV): ber. für C₂₃H₂₈N₂O₄S: 452.1770; gef.: 452.1766. -(4*S*)-**2c**: *R*_f = 0.70 (Ethylacetat/Petrolether 60/40); Schmp. 82.5–83 °C; [α]_D²⁵ = -21.2 (c = 1.3 in CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35–7.25 (m, 10 H, ArH), 4.75 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.50 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.45 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.29 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-3a), 4.21 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H, CH₂Ph), 4.20 (dd, *J* = 4.6, 7.9 Hz, 1 H, H-6a), 3.65 (s, 3 H, CH₃), 3.58 (s, 1 H, H-4), 2.75 (d, *J* = 12.9 Hz, 1 H, H-6), 2.69 (dt, *J* = 7.5, 17.3 Hz, 1 H, CH₂C(O)), 2.56 (dd, *J* = 4.8, 12.9 Hz, 1 H, H-6), 2.26–2.19 (m, 3 H, CH₂C(O)), 1.78 (Quintett, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₂); IR (CHCl₃): ν̄ = 1725, 1700, 1680 cm⁻¹; HR-MS (EI, 70 eV): ber. für C₂₃H₂₈N₂O₄S: 452.1770; gef.: 452.1760.

Eingegangen am 9. Juni 1995 [Z 8078]

Stichworte: Acyliminium-Ionen · Biotin · Cyclisierungen · Silylenolether · Totalsynthesen

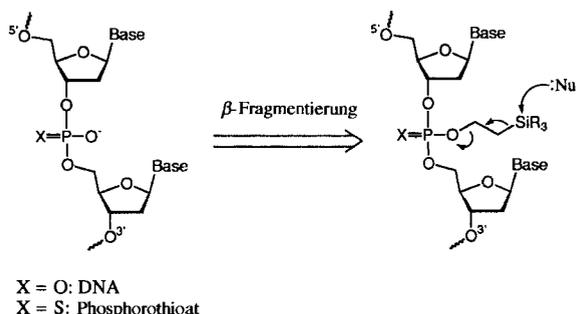
- [1] Für frühe Synthesen von D-(+)-Biotin siehe: a) M. W. Goldberg, L. H. Sternbach, US-A 2489232, **1949** [Chem. Abstr. **1951**, 45, 184b]; b) H. Ohruai, S. Emoto, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 2765; c) P. N. Confalone, G. Pizzolato, E. G. Baggolini, D. Lollar, M. R. Uskokovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 7020; d) T. Ogawa, T. Kawano, M. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1977**, 57, C31; e) H. Ohruai, N. Sueda, S. Emoto, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 865; f) J. Vasilievskis, J. A. Gualtieri, S. D. Hutchings, R. C. West, J. W. Scott, D. R. Parrish, F. T. Bizzarro, G. F. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7423; g) F. G. M. Vogel, J. Paust, A. Nürrenbach, *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1922.
- [2] Biosynthese von D-(+)-Biotin: a) R. J. Parry, *Tetrahedron* **1983**, 39, 1215; b) A. Marquet, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1249; c) P. Baldet, H. Gerbling, S. Axiotis, R. Douce, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 217, 479.
- [3] Die erste Isolierung ist beschrieben in: V. du Vigneaud, D. B. Melville, J. Rachele, *J. Biol. Chem.* **1941**, 140, 763.
- [4] a) Themenheft: *Ann. Acad. Sci.* **1985**, 447, 1–441; b) M. R. Uskokovic, *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* 3rd Ed. **1978–1984**, 24, 41.
- [5] Für einige Anwendungen siehe: a) M. Ahlers, W. Müller, A. Reichert, H. Ringsdorf, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1310; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1269; b) O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5076; c) H. Martini, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 287; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 278; d) I. Sanyal, S.-L. Lee, D. H. Flint, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2637.
- [6] Für weitere Synthesen von D-(+)-Biotin siehe: a) R. R. Schmidt, M. Maier, *Synthesis* **1982**, 747; b) R. A. Volkmann, J. T. Davis, C. N. Meltz, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5946; c) T. Ravindramathan, S. V. Hiremath, D. Reddy, A. V. R. Rao, *Carbohydr. Res.* **1984**, 134, 332; d) E. Poetsch, M. Casutt, *Chimia* **1987**, 41, 148; e) H. L. Lee, E. G. Baggolini, M. R. Uskokovic, *Tetrahedron* **1987**, 43, 4887; f) E. J. Corey, M. M. Mehrotra, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 57; g) R. Bihovsky, V. Bodepudi, *Tetrahedron* **1990**, 46, 7667; h) T. Fujisawa, M. Nagai, Y. Koike, M. Shimizu, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5865; i) F. D. Deroose, P. J. De Clercq, *ibid.* **1995**, 60, 321.

- [7] a) R. Kober, K. Papadopoulos, W. Miltz, D. Enders, W. Steglich, H. Reuter, H. Puff, *Tetrahedron* **1985**, 41, 1693; b) T. Allmendinger, G. Rihs, H. Wetter, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 395; c) R. M. Williams, P. J. Sinclair, D. Zhai, D. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1547; d) H. H. Mooiweer, K. W. A. Ettema, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, *Tetrahedron* **1990**, 46, 2991; e) E. C. Roos, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, B. Kaptein, J. Kamphuis, H. E. Schoemaker, *Recl. Trav. Chim. Pays Bas* **1992**, 111, 360.
- [8] N. J. Newcombe, Y. Fang, R. J. Vijn, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 767.
- [9] a) A. Schöberl, R. Hamm, *Chem. Ber.* **1948**, 81, 210; b) M. Casutt, E. Poetsch, W. N. Speckamp (Merck GmbH), DE-A 3926690, **1991** [Chem. Abstr. **1991**, 115, 8429k].
- [10] Die Hydroxy- und Ethoxyimidazolidinone wurden Flash-chromatographisch gereinigt, wobei das verwendete Kieselgel mit Ammoniak vorbehandelt wurde, um die Eliminierung von Wasser bzw. Ethanol zu verhindern. Alle Reaktionsprodukte wurden durch IR- und NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie charakterisiert.
- [11] E. Nakamura, T. Murofushi, M. Shimizu, I. Kuwajima, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 2346.
- [12] a) H. Hiemstra, W. N. Speckamp in *The Alkaloids*, Vol. 32 (Hrsg.: A. Brossi), Academic Press, San Diego, **1988**, S. 271–239; b) H. de Koning, M. J. Mooleenaar, H. Hiemstra, W. N. Speckamp in *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 13 (Hrsg.: Atta-ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 473–518.

Phosphorothioate: β-Fragmentierung gegen β-Silicium-Effekt**

Achim H. Krotz*, Patrick Wheeler und Vasulinga T. Ravikumar

Modifizierte Oligonucleotide können als Antisense-Therapeutica wirken^[1]. Unter den bisher berichteten DNA-Modifikationen waren Phosphorothioate die erste Verbindungsklasse, die zu klinischen Versuchen am Menschen herangezogen wurde^[2]. Um im großen Maßstab durchgeführte Oligonucleotidsynthesen zu optimieren, untersuchen wir neue Phosphor-haltige Schutzgruppen^[3,4]. Bei der automatischen DNA-Synthese werden meist β-Cyanethyl-3'-phosphoramidite eingesetzt^[5]. Die Schutzgruppen werden dabei selektiv durch β-Eliminierung entfernt^[6]. Die Möglichkeit, β-Silylethyl-geschützte Oligonucleotide mit Nucleophilen selektiv durch β-Fragmentierung zu spalten^[4,7] (Schema 1), veranlaßte uns, eine Reihe von



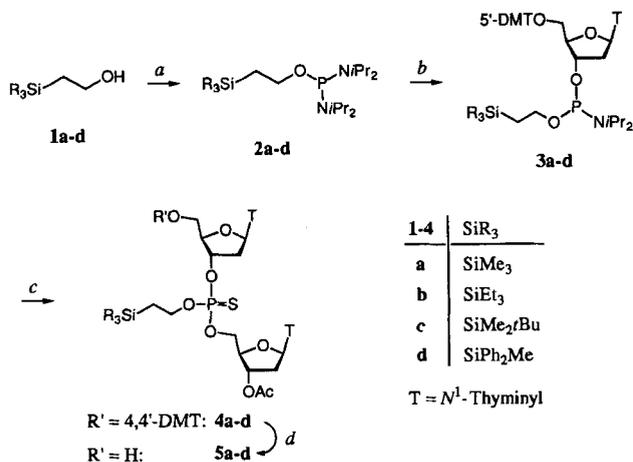
Schema 1. Selektive Abspaltung der Schutzgruppen der β-Silylethyl-geschützten Oligonucleotide durch β-Fragmentierung.

[*] Dr. A. H. Krotz, P. Wheeler, Dr. V. T. Ravikumar
Isis Pharmaceuticals
2292 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 (USA)
Telefax: Int. + 6 19/9 29-05 28
E-mail: achim_krotz@isisph.com

[**] Die Autoren danken Dr. T. K. Wyrzykiewicz und Dr. D. L. Cole für hilfreiche Diskussionen.

Alkyl- und Alkyl-/Aryl-substituierten β -Silylethylphosphoramiditen im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit in der Oligonucleotidsynthese zu testen.

Die Synthese der vier 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidinyl-3'-[2-(trialkyl/arylsilyl)ethyl-*N,N*-diisopropyl]phosphoramidite **3a-d** (**a-d**: $R_3 = Me_3, Et_3, Me_2tBu, Ph_2Me$) ist in Schema 2 gezeigt. Die benötigten β -Silylethanol-Derivate sind entweder

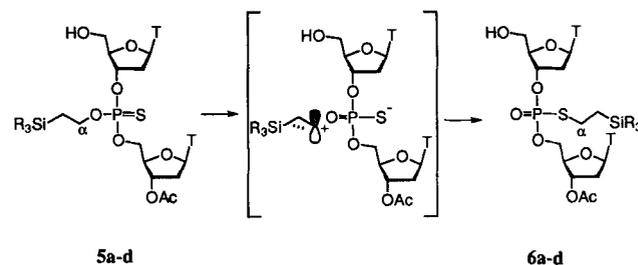


Schema 2. Synthese der β -Silylethyl-geschützten Phosphorothioate. a: PCl_3 (4 Äquiv.), Et_2O , Raumtemperatur (RT), 2 h, dann $HNiPr_2$ (7 Äquiv.), Et_2O , RT, 24 h, 85–95%; b: 1*H*-Tetrazol, 5'-*O*-DMT-Thymidin, CH_3CN , RT, 2–3 h, 65–85%; c: 1*H*-Tetrazol, 3'-*O*-Ac-Thymidin, 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid, CH_3CN , RT, 5 h, 77–88%; d: 2proz. DCA in CH_2Cl_2 , RT, 5 min, 95%. DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl; DCA = Dichloressigsäure.

käuflich (**1a**, **1d**) oder wurden aus Trialkylvinylsilan-Vorläufern synthetisiert (**1b**, **1c**)^[8]. Im Falle von **1c** stellten wir zunächst aus *t*BuMe₂SiCl und (1-Methoxyvinyl)lithium (1-Methoxyvinyl)dimethylsilan (76% Ausbeute) her. Die anschließende regio-selektive Hydroborierung/Oxidation mit 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan(9-BBN) (2 Äquiv.)/ H_2O_2 ergab **1c** (92%). Entsprechend der Standardarbeitsvorschrift (siehe Experimentelles) wurden **1a-d** zunächst mit PCl_3 (4 Äquiv.) und nach Aufarbeitung mit wasserfreiem $HNiPr_2$ (7 Äquiv.) umgesetzt, was die Bis(*N,N*-Diisopropylamino)-2-trialkyl/arylsilylethoxyphosphine **2a-d** in nahezu quantitativer Ausbeute ergab. Bei der anschließenden Phosphitylierung wurden **2a-d** (2 Äquiv.) zunächst in wasserfreiem CH_3CN mit 1*H*-Tetrazol (0,8 Äquiv.) 20 min aktiviert, und diese Mischung wurde zu 5'-*O*-DMT-Thymidin (DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl) gegeben. Die hydrophoben Reaktionsprodukte waren sowohl gegen die wässrige Aufarbeitung (0,5 M $NaHCO_3$) als auch eine Flash-Chromatographie auf Kieselgel stabil. Mischungen der R_p/S_p -Diastereomere **3a-d** (Verhältnis ca. 1:1) wurden in guter Ausbeute (65–85%) als farblose, glasähnliche Feststoffe erhalten. Zur Untersuchung der Verträglichkeit der Schutzgruppen mit den bei der automatischen Synthese üblicherweise genutzten Bedingungen (Kupplung, Oxidation, Abspaltung der 5'-Schutzgruppen, Abspaltung der P-Schutzgruppen) synthetisierten wir Homo-Thymidin-Phosphorothioat-Dimere als Modellsubstrate. Die Kupplung von **3a-d** (2 Äquiv.) mit 3'-*O*-Acetylthymidin in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol (4 Äquiv.) in wasserfreiem CH_3CN , gefolgt von der Oxidation der resultierenden Trialkylphosphite mit 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid^[9] (5 Äquiv.) lieferte nach Säulenchromatographie (³¹P-NMR: $\delta = 67$ –68, zwei Signale R_p/S_p -Isomere) die geschützten Phosphorothioate **4a-d** in hohen Ausbeuten (77–88%).

Da einer der Schlüsselschritte in der DNA-Synthese die Abspaltung der 5'-*O*-DMT-Schutzgruppen mit organischen Säure-

ren ist, müssen die Phosphor-haltigen Schutzgruppen gegen Säure stabil sein. Abspaltung der 5'-Schutzgruppen von **4a-d** mit 2proz. Dichloressigsäure(DCA)/ CH_2Cl_2 innerhalb von 5 min ergibt **5a-d** in hoher Ausbeute. Werden die *O,O,O*-Trialkylphosphorothioate **4a-d** oder **5a-d** länger den Reaktionsbedingungen ausgesetzt, so resultierte eine effiziente und selektive O-S-Wanderung der Schutzgruppe, was die *O,O,S*-Trialkylphosphorothioate **6a-d** lieferte (Schema 3). 22 h Behandlung



Schema 3. Umlagerung von *O,O,O*-Trialkylphosphorothioaten. Das intermediäre β -Silyl-substituierte Kation kann durch (σ -p)_x-Überlappung (β -Silicium-Effekt) hyperkonjugativ stabilisiert werden. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung k_2 [$10^{-5} s^{-1}$] ($t_{1/2}$ [h]) für die Umlagerung **5** → **6** in 2proz. DCA/ CD_2Cl_2 bei 20 °C betragen: a: 3.3 (5.8), b: 21 (0.9); c: 3.5 (5.5) bzw. d: 0.05 (385).

von **5c** mit 2proz. DCA/ CH_2Cl_2 ergab **6c** in 88% Ausbeute. Das TOCSY-Spektrum von **6c** zeigt eine starke Kopplung zwischen dem Multiplett bei $S = 3$ (CH_2S) und dem bei $S = 1$ ($SiCH_2$), die bestätigt, daß nun die $R_3SiCH_2CH_2$ -Gruppe und nicht eines der Nucleoside an den Schwefel gebunden ist. Die Umsetzung von **6c** unter den gleichen Reaktionsbedingungen zeigt, daß die Isomerisierung irreversibel ist. Die O-S-Wanderung der Alkylgruppen der *O,O,O*-Trialkylphosphorothioate, allgemein als Thion-Thiol-Umlagerung bezeichnet, wird thermisch, durch Halogenalkane, durch elektronische Faktoren oder Einfluß durch Lewis- oder Brönstedt-Säuren herbeigeführt^[10]. Mechanistische Studien bewiesen, daß während der Reaktion ein (Alkyl⁺)(Thiophosphat⁻)-Ionenpaar gebildet wird. Eine interne Rückkehr des Kations zum nucleophileren Schwefelatom des ambidenten Phosphorothioat-Ions führt dann zur Bildung der thermodynamisch stabileren *O,O,S*-Trialkylphosphorothioate^[10c,d]. Um die relative Stabilität der vier β -Silylethylgruppen unter den Bedingungen zur Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppen quantitativ zu bestimmen, analysierten wir ³¹P-NMR-spektroskopisch die Verteilung der Phosphor-haltigen Verbindungen in Lösungen von **5a-d** (0,01 mmol) in 2proz. DCA/ CD_2Cl_2 (0,24 M, 0,6 mL). Der zeitliche Verlauf der Isomerisierung von **5b** ist in Abbildung 1 gezeigt. **5a-c** ($\delta = 67$) isomerisieren schnell zu **6a-c** ($\delta = 32$) (Schema 3). Unter den gleichen Bedingungen isomerisiert **5d** nur sehr langsam ($t_{1/2} = 385$ h). Die ungewöhnlich hohen Isomerisierungsgeschwindigkeiten von **5a-c** unterstützen einen säurekatalysierten Isomerisierungsmechanismus über ein Ionenpaar-Intermediat (Schema 3), da Silylsubstituenten positive Ladungen in β -Position durch (σ -p)_x-Überlappung stabilisieren können (β -Silicium-Effekt)^[11]. Im Falle von **5d** könnte die niedrigere Isomerisierungsgeschwindigkeit auf eine erniedrigte Elektronendichte der C-Si- σ -Bindung durch Elektronenzug der Phenylgruppen und/oder sterische Hinderung zurückzuführen sein^[12]. Lösungen von 2-(Diphenylmethylsilyl)ethyl-geschützten Phosphorothioaten in $CDCl_3$, CD_2Cl_2 , [D_6]Aceton, [D_3]Acetonitril, [D_7]DMF, [D_6]DMSO, [D_4]MeOH, EtOH und 1,2-Dichlorethan enthielten bei 20 °C nach vier Wochen keine Umlagerungsprodukte. In 80proz. Essigsäure wurden sowohl Solvolyse als auch Umlagerung beobachtet.

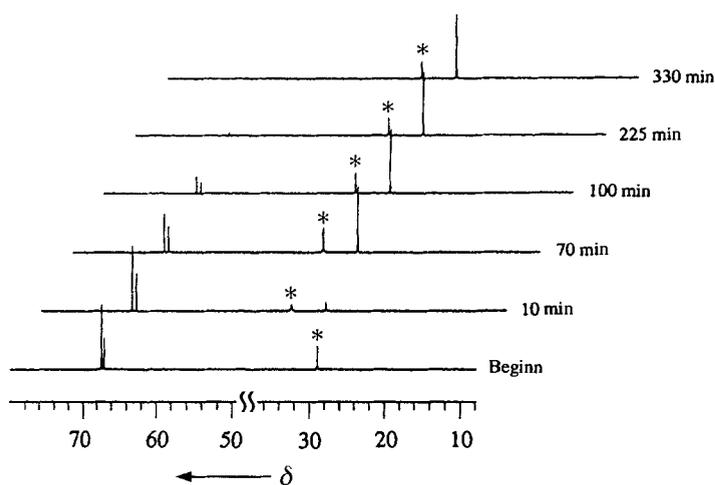


Abb. 1. ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Thion-Thiol-Umlagerung von **5b** in 2proz. DCA/ CD_2Cl_2 (161.9 MHz). Die Intensität der Signale der zwei R_p/S_p -Diastereomere der *O,O,O*-Trialkylphosphorothioate **5b** ($\delta = 67, 67.5$) nimmt mit der Zeit ab, die der Signale der *O,O,S*-Trialkylphosphorothioate **6b** ($\delta = 32$) nimmt zu. Das anfängliche Spektrum wurde in CD_2Cl_2 aufgenommen. * Triphenylphosphin-oxid ($\delta = 36.7$) wurde als interner Standard für die Quantifizierung benutzt.

Der letzte Schritt der Oligonucleotidsynthese ist die Entfernung der Schutzgruppen vom Rückgrat und den Basen. Die Behandlung von **5a-d** mit 30proz. $\text{NH}_4\text{OH}/\text{D}_2\text{O}/\text{Ethanol}$ 63:7:30 (v/v/v) führte selektiv zu den Phosphorothioaten **7a-d** (^{31}P -NMR: $\delta = 56$), es entstanden aber auch merkbare Mengen der Dialkylphosphate **8a-d** (3–40%, $\delta = 0.1$) (Abb. 2 unten). Dies erstaunte uns vor allem deshalb, weil **5a-d** keine

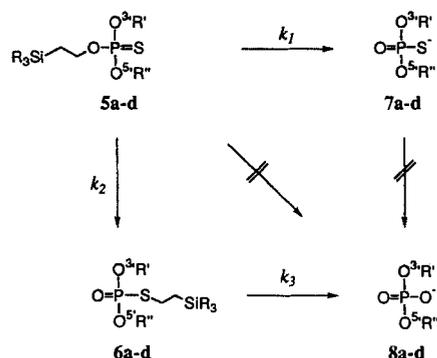
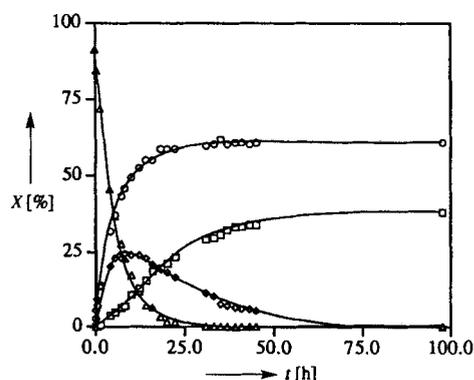


Abb. 2. ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Abspaltung der Schutzgruppen von **5c** in 30proz. $\text{NH}_4\text{OH}/\text{D}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (67:7:30, v/v/v). Oben: Relativer Anteil X von *O,O,O*-Trialkylphosphorothioat **5c** ($\delta = 67.3, 67.4, \Delta$), *O,O,S*-Trialkylphosphorothioat **6c** ($\delta = 31.7, 31.8, \diamond$), *O,O*-Dialkylphosphorothioat **7c** ($\delta = 55.07, 56.13, \circ$) und Phosphorsäurediester **8c** ($\delta = 0.1, \square$) als eine Funktion der Zeit. Unten: Unter den zuvor angeführten Bedingungen konkurrierende Reaktionen.

O,O,O-Trialkylphosphat-Verunreinigungen enthielten. Das Verfolgen des zeitlichen Verlaufs der Abspaltung der Schutzgruppen mit ^{31}P -NMR-Spektroskopie brachte Licht in dieses unerwartete Ergebnis (Abb. 2). Die Abspaltung der Schutzgruppen von **5a-d** liefert durch β -Fragmentierung **7a-d**. In einer konkurrierenden Reaktion findet aber ebenso die Umlagerung von **5a-d** zu **6a-d** statt (Abb. 2, unten). Das Verschwinden von **5a-d** folgt einer Kinetik erster Ordnung, die Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung (k_d) wurden aus dem Intensitätsabfall der ^{31}P -NMR-Signale von **5a-d** berechnet (Tabelle 1). k_d umfaßt die Geschwindigkeitskonstante der Hy-

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung ($\times 10^5$) [s^{-1}] für die Abspaltung der Schutzgruppen/Umlagerung von **5a-d** in $\text{NH}_4\text{OH}/\text{Ethanol}$ bei 20°C .

	5a	5b	5c	5d
k_d	11.7	10.2	5.1	0.23
			10 [a]	schnell [a, b]
k_1	10.2	7.5	3.1	0.22
			10 [a]	schnell [a, b]
k_2	1.5	2.7	2.0	0.007
	3.3 [c]	21 [c]	3.5 [c]	0.05 [c]

[a] Abspaltung der Schutzgruppen mit Bu_4NF in THF, RT (2 Äquiv., 25 mM). [b] Abspaltung der Schutzgruppen innerhalb von Minuten. [c] Umlagerung in 2proz. DCA/ CH_2Cl_2

drolyse von **5a-d**, k_1 , und die Geschwindigkeitskonstante der Umlagerung, k_2 [Gl. (a)]. Eine höhere Elektrophilie der Phos-

$$k_d = k_1 + k_2 \quad (\text{a})$$

phorothioatgruppe von **6a-d** beschleunigt die Hydrolyse (k_3) am Phosphorzentrum und ermöglicht die Bildung der entsprechenden Diester **8a-d**^[13] [Gl. (b)]. Die maximale Konzentra-

$$d[6]/dt = k_2[5] - k_3[6] \quad (\text{b})$$

tion (24%) des Intermediats **6c** ist nach ca. 8 h erreicht. Sie nimmt danach bis auf 0% ab, während der Diestergehalt sich seiner Endkonzentration annähert. Das Verhältnis aus Phosphorothioaten **7a-d** und Phosphorsäurediestern **8a-d** plus *O,O,S*-Trialkylphosphorothioaten **6a-d** spiegelt direkt die relativen Geschwindigkeiten der Hydrolyse und der Umlagerung wider [Gl. (c)]. Mit den Gleichungen (a) und (c) können die Ge-

$$[7a-d]/[8a-d + 6a-d] = k_1/k_2 \quad (\text{c})$$

schwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung k_1 und k_2 berechnet werden (Tabelle 1). k_1 nimmt mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten am Silicium ab [$k_1(\mathbf{5a}) > k_1(\mathbf{5b}) > k_1(\mathbf{5c}) > k_1(\mathbf{5d})$]. Die k_2 -Werte von **5a-c** liegen in der gleichen Größenordnung, der Wert von **5d** ist jedoch drastisch kleiner. Im Falle von **5d** beobachteten wir kein Intermediat **6d** im ^{31}P -NMR-Spektrum. Die umgekehrte Proportionalität der NH_4OH -Konzentration mit dem Phosphorsäurediestergehalt (Abb. 3) ist mit der Vorstellung vereinbar, daß **6d** tatsächlich als ein Intermediat gebildet, aber schneller hydrolysiert wird ($k_3 > k_2$). Eine Absenkung der NH_4OH -Konzentration erniedrigt die Hydrolysegeschwindigkeit, beeinflusst k_2 aber kaum. Die Abspaltung der Schutzgruppen von **5d** in Methylamin/Wasser ist ca. 20mal schneller als in NH_4OH , und in 40proz. Methylamin wird die Bildung der Dialkylphosphate vollkommen unterdrückt. Mit noch nucleophileren Reagentien wie Bu_4NF werden innerhalb von Minuten alle Schutzgruppen abgespalten.

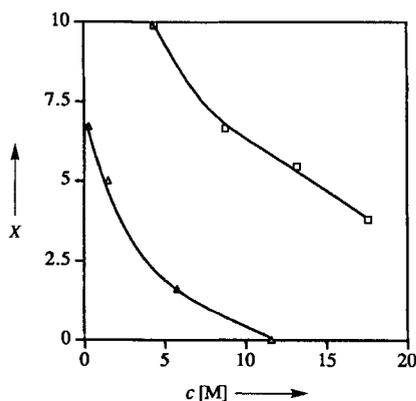


Abb. 3. Abspaltung der Schutzgruppen von **5d** in 30proz. wäßriger Ammoniaklösung (\square) und wäßriger Methylaminlösung (Δ) bei 62 °C. Das Verhältnis Phosphorothioat zu Phosphorothioat (X [%]) hängt von der Konzentration und Nucleophilie der Base ab. In 40proz. wäßriger Methylaminlösung bildet sich kein Phosphorothioat.

Wir haben gezeigt, daß β -Silylethyl-geschützte *O,O,O*-Trialkylphosphorothioate effizient aus den Phosphoramiditen **3a–d** hergestellt werden konnten. Die Abspaltung der Schutzgruppen mit nucleophilen Agentien (Ammoniumhydroxid, Methylamin, Fluorid^[4, 7]) führte durch β -Fragmentierung selektiv zu den Phosphorothioaten **7a–d**. Die Phosphor-Schutzgruppen von **4/5a–c** sind deutlich anfällig für eine schnelle, durch β -Silicium-Effekt unterstützte Thion-Thiol-Umlagerung, wobei die *O,O,S*-Trialkylphosphorothioate **6a–c** entstehen, die unter den Bedingungen zur Abspaltung der Schutzgruppen in die Dialkylphosphate **8a–c** übergehen. Die Eigenschaften der 2-(Methyldiphenyl)silylethoxy-Gruppe in **5d** lassen jedoch auch dessen Einsatz in der Oligophosphorothioat-Synthese zu, das heißt, die durch den β -Silicium-Effekt geförderte Thion-Thiol-Umlagerung wird sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen weitestgehend unterdrückt, während die selektive Abspaltung der Schutzgruppen unter milden Bedingungen durch eine β -Fragmentierung stattfindet.

Experimentelles

2a–d: Alle Arbeitsschritte wurden unter Feuchtigkeitsausschluß (Ar-Atmosphäre) durchgeführt. Zu einer eisgekühlten Lösung von PCl_3 (27.5 g, 200 mmol) in wasserfreiem Et_2O (100 mL) wurde tropfenweise eine Lösung der β -Silylethanol-Derivate **1a–d** (50 mmol) in wasserfreiem Et_2O (50 mL) gegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung nach 2 h im Vakuum eingengt (20 Torr, dann 1 Torr). Es wurde wasserfreies Et_2O (200 mL) und anschließend tropfenweise HNiPr_2 (50 mL) hinzugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **2a–d** als farblose Öle in nahezu quantitativer Ausbeute anfielen. $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 123.7$ (**2a**), 124.4 (**2b**), 123.9 (**2c**), 123.4 (**2d**).

3a–d: Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde 1*H*-Tetrazol (12 mmol) zu einer gerührten Lösung von **2a–d** (30 mmol) in wasserfreiem CH_3CN (600 mL) gegeben. Nach 20 min wurde diese Lösung innerhalb von 30 min zu 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidin (15 mmol) gegeben. Nach 2–3 h wurde Triethylamin (30 mL) hinzugefügt und die Lösung 12 h bei -20 °C gelagert. Nach Filtration wurde die Lösung im Vakuum eingengt. Der ölige Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und die Lösung mit NaHCO_3 (1 M) und H_2O extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4), eingengt und das verbleibende Öl durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel (Eluent: *n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 90/10/0.1) gereinigt und **3a–d** isoliert. $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 145.9$, 146.1 (**3a**), 145.8, 146.0 (**3b**), 145.9, 146.1 (**3c**), 146.0, 146.3 (**3d**).

4a–d: Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde 1*H*-Tetrazol (6 mmol) zu einer gerührten Lösung von **3a–d** (2 mmol) und 3'-*O*-Acetylthymidin (1 mmol) in wasserfreiem CH_3CN (10 mL) gegeben. Nach 2 h wurde eine Lösung von 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid (5 mmol) in wasserfreiem CH_3CN (5 mL) hinzugefügt. Nach 30 min wurde Triethylamin (1 mL) hinzugefügt und die Mischung filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und die Lösung mit wäßrigem NaHCO_3 (0.5 M) und H_2O extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und eingengt. Aus dem Rückstand wurden nach

Reinigung durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel (Eluent: *n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 50/50/0.1 bis 20/80/0.1) **4a–d** isoliert. $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 67.5$, 67.6 (**4a**), 67.6, 67.7 (**4b**), 67.2, 67.5 (**4c**), 67.4, 67.5 (**4d**).

Eingegangen am 3. Mai 1995 [Z 7953]

Stichworte: Antisense-Oligonucleotide · Nachbargruppeneffekte · Nucleotide · Phosphorverbindungen · Umlagerungen

- [1] S. T. Croke in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Vol. 1 (Hrsg.: M. E. Wolff), Wiley, 1995, S. 863–900, zit. Lit.
- [2] S. T. Croke, *Annual Meeting of the Federation of the American Society of Experimental Biology (FASEB)*, April, 1994, Anaheim, CA, USA.
- [3] Ein Homo-Thymidinphosphorsäurediester-Dodecamer (T_{12}) mit einem mittleren Kupplungsgrad von 98.5% wurde auf CPG mit 2-(Methylphenylmethylsilyl)ethylphosphoramidit **3d** synthetisiert: a) V. T. Ravikumar, H. Sasmor, D. L. Cole, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2637–2640; b) V. T. Ravikumar, T. K. Wyrzykiewicz, D. L. Cole, *Tetrahedron* **1994**, 50, 9255–9266.
- [4] Ein Homo-Thymidinphosphorothioat-Heptamer (T_7) wurde mit einem mittleren Kupplungsgrad von 99% auf CPG mit Hilfe von **3d** synthetisiert: V. T. Ravikumar, D. L. Cole, *Gene* **1994**, 149, 157–161.
- [5] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.
- [6] N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5843–5846.
- [7] S. Honda, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2093–2096.
- [8] J. A. Soderquist, I. Rivera, A. Negron, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4051–4055.
- [9] R. P. Iyer, L. R. Phillips, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4693–4699.
- [10] a) H. Teichmann, G. Hilgetag, *Angew. Chem.* **1967**, 79, 1077–1088; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1967**, 6, 1013–1023; b) R. G. Cooks, A. F. Gerrard, *J. Chem. Soc. B* **1968**, 1327–1333; c) K. Bruzik, W. J. Stec, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 1625–1630; d) C. D. Poulter, D. S. Mautz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4895–4903.
- [11] J. B. Lambert, *Tetrahedron* **1990**, 46, 2677–2689, zit. Lit.
- [12] N. Shimizu, S. Watanabe, F. Hayakawa, S. Yasuhara, Y. Tsuno, T. Inazu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, 67, 500–504.
- [13] In einem Kontrollexperiment spalteten wir von **6c** die Schutzgruppen unter den gleichen Bedingungen ab. **8c** war das einzige Produkt ($^{31}\text{P-NMR}$ $\delta = 0.02$), $k_3 = 1.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 13.4 \text{ h}$).

Totalsynthese von (+)-SF 2315A und Bestimmung der absoluten Konfiguration dieses Naturstoffs**

Kyungjin Kim und Gary A. Sulikowski*

Auf der Suche nach neuen Antibiotica wurde bei einem Screening von Boden-Mikroorganismen das Antibioticum SF 2315A **1** entdeckt^[1]. Nach den spektroskopischen Befunden weist **1** ein Benz[*a*]anthracen-Grundgerüst auf, weshalb man die Verbindung der Familie der Angucyclin-Antibiotica zugeordnet hat^[2]. Die relative Konfiguration von **1** wurde durch eine Einkristall-Röntgenstrukturanalyse bestimmt, die absolute Konfiguration von **1** konnte bisher nicht festgelegt werden^[1b]. SF 2315A **1** weist eine schwache Aktivität gegenüber Gram-po-

*] Prof. G. A. Sulikowski, K. Kim
Department of Chemistry, Texas A & M University
College Station, TX 77843-3255 (USA)
Telefax: Int. + 409/845-4719

**] Diese Arbeit wurde von der Welch Foundation (A1230) und der Texas A & M University gefördert. Dr. Toru Sasaki (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) danken wir für die freundliche Überlassung einer Probe von authentischem SF 2315A. G. A. S. dankt der American Cancer Society für einen Junior Faculty Research Award und der American Cyanamid Company für einen Cyanamid Faculty Award.