

Fritz Eckstein und Ibrahim Rizk

Synthese von Oligodesoxynucleotiden über Phosphorsäuretriestern^{1,2)}

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
(Eingegangen am 10. Januar 1969)

Eine neue Methode zur Synthese von Oligodesoxynucleotiden wird untersucht, bei der die Internucleotid-Phosphorsäuregruppe mit dem durch Zink abspaltbaren Trichloräthylrest verestert ist. Auf diese Weise werden d(TpT), d(TpTpT), d(TpTpTpT), d(CpT), d(ApT), d(ApA) und d(ApApA) synthetisiert. Mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanz wird wahrscheinlich gemacht, daß durch Aktivierung von Nucleosid-3'-phosphorsäure-trichloräthylestern mit 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid ein Pyrophosphorsäure-tetraester (18) gebildet wird, der mit der 5'-OH-Gruppe eines Nucleosids zu dem Dinucleosidphosphorsäure-trichloräthylester reagiert.

Die chemische Synthese von Oligodesoxynucleotiden wird heutzutage fast ausschließlich durch Aktivierung von Desoxynucleosid-5'-phosphaten mit einem Kondensationsmittel wie z. B. 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (TPS) und Zugabe eines Desoxynucleosides oder eines Desoxynucleosid-5'-phosphats mit geschützter Phosphatgruppe erreicht. *Khorana* und Mitarbb.³⁾ haben durch Kombination dieser chemischen mit enzymatischen Methoden Polydesoxynucleotide mit einer Kettenlänge bis zu 30 Basen dargestellt. Wir versuchten nun, die Synthese solcher Oligo- und Polydesoxynucleotide noch einfacher zu gestalten.

Durch die negative Ladung an der Phosphatgruppe der Internucleotidbindung sind die Reaktionsprodukte nur in polaren Lösungsmitteln löslich und, jedenfalls in großen Mengen, nur an Ionenaustauschersäulen mit stark begrenzter Kapazität trennbar. Diese negative Ladung ist prinzipiell auch noch nucleophil genug, um mit dem Kondensationsmittel zu reagieren und so die einmal geknüpfte Internucleotidbindung wieder zu aktivieren. Das kann zu Kettenbrüchen und unerwünschten Nebenprodukten führen.

Wir hofften, daß eine Blockierung dieser negativen Ladung sowohl eine bessere Löslichkeit in wenig polaren Lösungsmitteln mit sich bringen als auch eine in größerem Maßstab durchführbare Trennung an Kieselgel ermöglichen würde. Darüber hinaus sollte eine solche Veresterung auch eine Aktivierung der Internucleotidbindung verhindern. Als Schutzgruppe wählten wir die mit Zink selektiv wieder abspaltbare⁴⁾ β,β,β -Trichlor-äthylgruppe. Wir hofften, daß der entstandene Phosphorsäuretriestern gegen schwaches Alkali stabil sein würde. *Letsinger* und *Ogilvie*⁵⁾ haben gleichzeitig mit uns die β -Cyan-äthylgruppe als Schutzgruppe

1) Dissertat. I. Rizk, Techn. Univ. Braunschweig 1969.

2) Vorläufige Mittel.: F. Eckstein und I. Rizk, *Angew. Chem.* 79, 684 und 939 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* 6, 695 und 949 (1967). Zum Teil vorgetragen auf dem 5. Internat. Symposium on the Chemistry of Natural Products, London 1968.

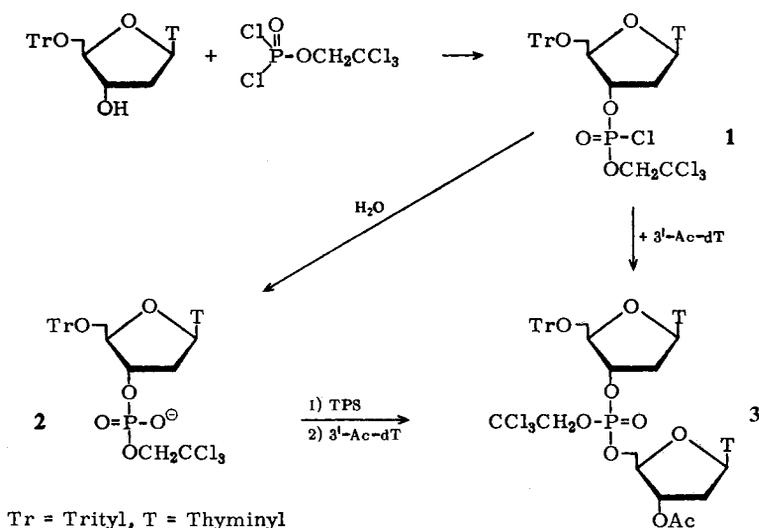
3) N. K. Gupta, E. Ohtsuka, V. Sagaramella, H. Buchi, A. Kumar, H. Weber und H. G. Khorana, *Proc. nat. Acad. Sci.* 60, 1338 (1968).

4) F. Eckstein, *Chem. Ber.* 100, 2236 (1967).

5) R. L. Letsinger und K. V. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 4801 (1967).

für die Internucleotidbindung vorgeschlagen, die durch Behandlung mit Alkali wieder entfernt werden kann. Dabei müssen jedoch neue Schutzgruppen⁶⁾ für die 3'-OH-Gruppe verwendet werden, da die üblichen im allgemeinen gegen Alkali labil sind. Die Phenyl-⁷⁾ und die Benzylgruppe⁸⁾ wurden ebenfalls zur Maskierung der negativen Ladung der Internucleotidbindung benutzt.

Die Einführung der Trichloräthylgruppe geschieht am einfachsten durch Umsetzung eines in der 5'-Stellung geschützten Nucleosids, z. B. 5'-*O*-Trityl-thymidin (1 Äquiv.), mit Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid⁹⁾ (1 Äquiv.) in Pyridin zu **1**, welches ohne Isolierung mit 3'-*O*-Acetyl-thymidin (0.3 Äquiv.) zu 5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-[[β,β,β -trichlor-äthylester] (**3**) mit 93% Ausbeute (bezogen auf Acetylthymidin) umgesetzt werden kann. Bei Verwendung von 1 Äquiv. Acetylthymidin sinkt die Ausbeute auf ca. 45%, was auf teilweise Hydrolyse von **1** zu **2** zurückzuführen ist. Frühere Versuche, mit Phosphorsäure-phenylester-dichlorid eine solche 3'→5'-Verknüpfung von Nucleosiden zu erreichen, ergaben nur Produkte mit 5'-5'-Verknüpfung¹⁰⁾. Auch wir erhalten bei nicht strikter Einhaltung der Vorschrift als Nebenprodukt Spuren des falsch verknüpften Tritylthymidylyl-(3'-3')-tritylthymidin-trichloräthylesters, der sich aber leicht von **3** abtrennen läßt.



Eine andere Darstellungsmöglichkeit von **3** besteht in der Hydrolyse von **1** zu **2**, das über Kieselgel gereinigt werden kann, Aktivierung von **2** mit TPS und anschließende Umsetzung mit 3'-*O*-Acetyl-thymidin zu **3**, das man mit 55% Ausbeute nach Reinigung über Kieselgel erhält.

6) a) G. W. Grams und R. L. Letsinger, *J. org. Chemistry* **33**, 2589 (1968); 6b) R. L. Letsinger, M. H. Caruthers, P. S. Müller und K. V. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 7146 (1967).

7) C. B. Reese und R. Salthill, *J. chem. Soc. [London]* **1968**, 767.

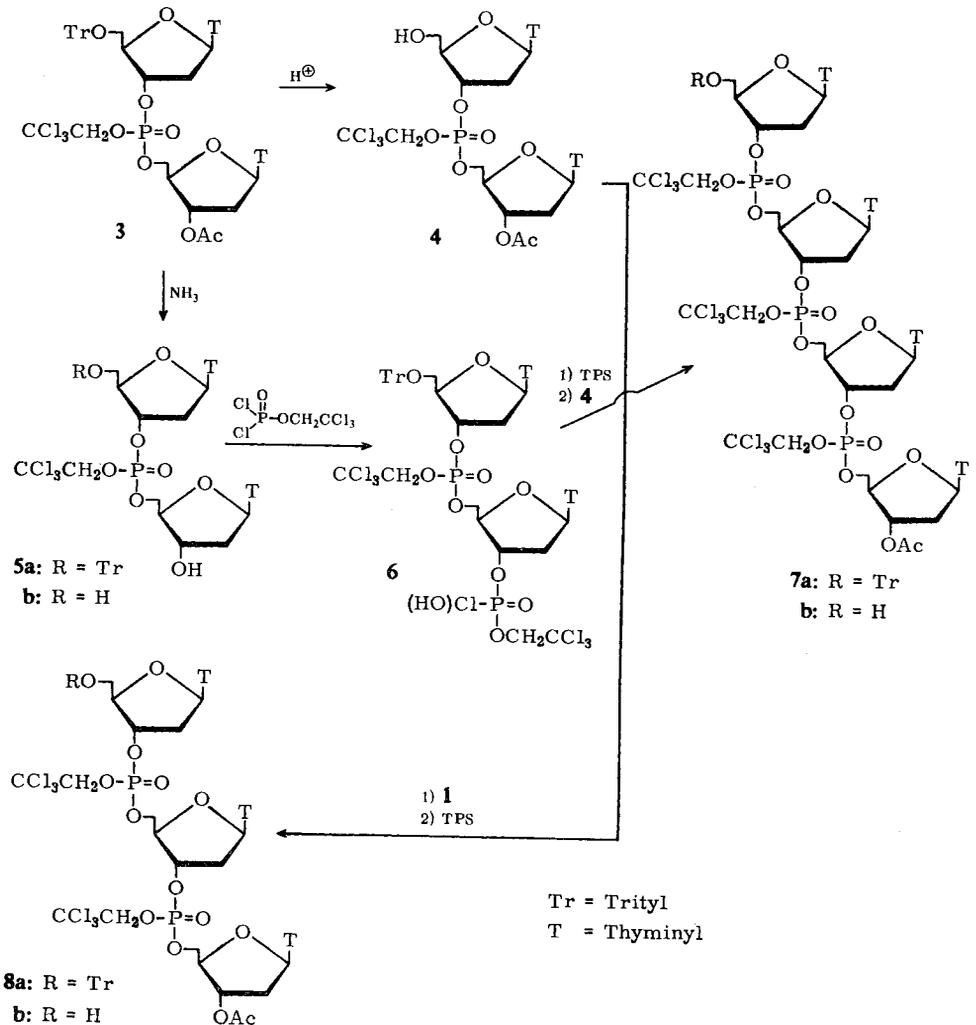
8) K. H. Scheit, *Tetrahedron Letters [London]* **1967**, 3243.

9) W. Gerrard, W. J. Green und R. J. Phillipps, *J. chem. Soc. [London]* **1954**, 1148.

10) H. G. Khorana, *Some recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*, S. 101, Wiley, New York, London 1961.

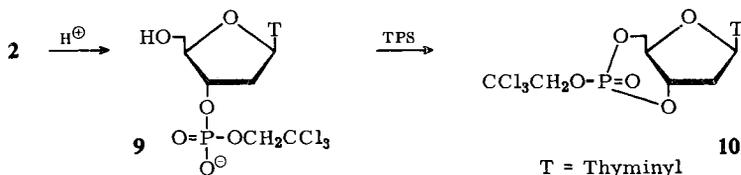
Eine Kombination dieser beiden Methoden liefert die besten Ausbeuten. Tritylthymidin wird mit Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid phosphoryliert, mit TPS umgesetzt, um evtl. entstandenes **2** zu aktivieren, und 3'-*O*-Acetyl-thymidin zugegeben. **3** wird so in 80% Ausbeute nach Schichtchromatographie an Kieselgel isoliert. Phosphoryliert man erst Acetylthymidin und gibt dann Tritylthymidin zu, so erhält man nur 15% **3**.

Aus **3** läßt sich einerseits mit Essigsäure leicht die Tritylgruppe zu Thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-trichloräthylester (**4**), andererseits mit Methanol/Ammoniak (1:1) die Acetylgruppe zu 5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-thymidin-trichloräthylester (**5a**) ohne Hydrolyse des Triesters abspalten.



5a kann wieder mit Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid zu **6** phosphoryliert, dieses mit TPS aktiviert und mit **4** zum Tetranucleotid **7a** (50% Ausb.) umgesetzt werden. Durch Kondensation von **1** mit **4** erhält man das Trinucleotid **8a** (Ausb. 65%).

Auch aus **2** läßt sich die Tritylgruppe abspalten zu Thymidin-3'-phosphorsäure-trichloräthylester (**9**), der mit Hilfe von TPS zu Thymidin-3':5'-cyclophosphorsäure-trichloräthylester (**10**) cyclisiert werden kann.



Die Abspaltung der Trichloräthylgruppe aus den Triestern kann, nach Hydrolyse der Tritylgruppe und Reinigung der enttritylierten Verbindung an Kieselgel, auf verschiedene Weise vorgenommen werden⁴⁾:

- durch Umsetzung in 80proz. Essigsäure mit Zinkstaub (Raumtemp., 20 Min.);
- durch Umsetzung in DMF mit aktiviertem Cu/Zn¹¹⁾ (50°, 60 Min.);
- mit Zinkstaub in Pyridin, das Spuren Essigsäure enthält (Raumtemp., 30 Min.)¹²⁾;
- durch Behandlung mit NaOH.

In allen Fällen ist es notwendig, das Zink mit verdünnter Essigsäure oder wäßrigem Pyridin gründlich zu waschen, um alles Nucleotidmaterial herauszulösen. Die Entfernung der Zink-Ionen geschieht durch einen sauren Ionenaustauscher. Das Eluat wird eingedampft, evtl. noch vorhandene Schutzgruppen werden abgespalten und die Reaktionsprodukte papierchromatographisch oder auf DEAE-Cellulosesäulen getrennt. In Tab. 1 sind die Ausbeuten für die Oligothymidylsäuren zusammengefaßt.

Tab. 1. Ausbeuten an Oligothymidylsäuren

Ausgangs-material	Menge μMol	Produkt	Methode	% Ausb.	Methode	% Ausb.
5b	10	d(TpT)	a	73	b	90
8b	7	d(TpTpT)	c	56	b	85
7b	8	d(TpTpTpT)	c	57	b	80
10	10	dT-3':5'-P ¹³⁾	—	—	b	95

Die durch Papierchromatographie gereinigten Oligonucleotide wurden mit auf anderen Wegen erhaltenem Material verglichen und durch Abbau mit Schlangengift- oder Milzphosphodiesterase identifiziert.

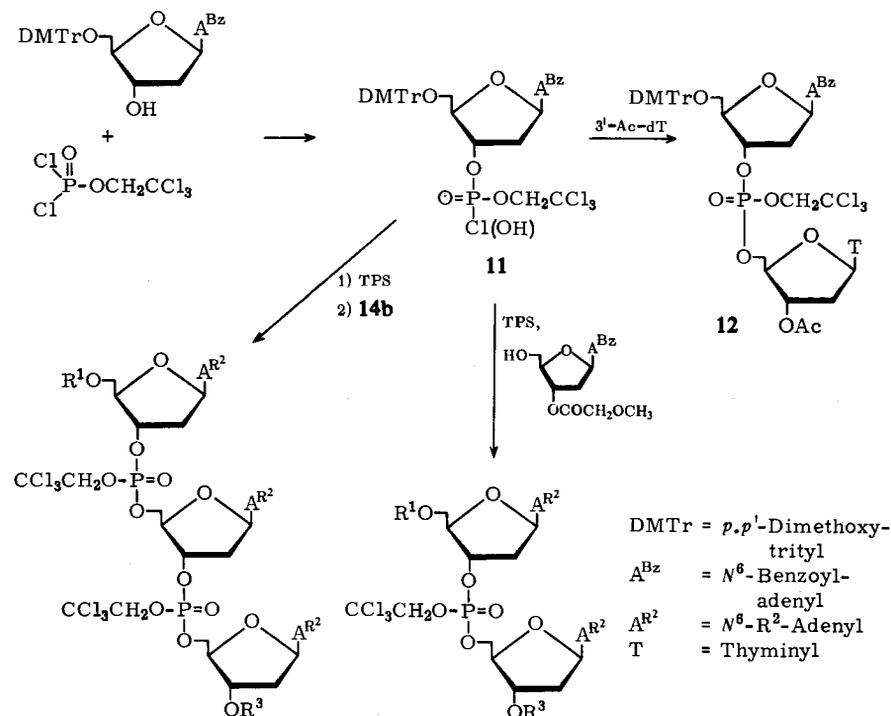
Nachdem wir festgestellt hatten, daß die Triestermethode jedenfalls auf das am leichtesten zu handhabende Desoxynucleosid, Thymidin, mit Erfolg anwendbar ist, versuchten wir die Methode auf die anderen Nucleoside zu übertragen. Bei der Verwendung von Desoxyadenosin in dieser Reaktion ist es vorteilhaft, die 6-NH₂-

¹¹⁾ F. LeGoff, J. org. Chemistry **29**, 2048 (1964).

¹²⁾ D. Bommer, unveröffentlicht.

¹³⁾ G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham und E. H. Pohl, J. Amer. chem. Soc. **80**, 6223 (1958).

Gruppe zu schützen, nicht nur weil sie evtl. an Stelle einer OH-Gruppe reagieren kann, sondern weil sie die Chromatographie der Produkte an Kieselgel wesentlich verschlechtert. Wir wählten dafür die Benzoylgruppe. Die von Khorana¹⁴⁾ angegebene Vorschrift zur Darstellung von *N*⁶-Benzoyl-desoxyadenosin haben wir durch Verwendung von Essigsäure an Stelle von Ionenaustauscher zur Neutralisation etwas vereinfacht. 5'-*O*-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-*N*⁶-benzoyl-desoxyadenosin¹⁴⁾ wird mit Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid zu **11** phosphoryliert. Dessen Umsetzung mit 3'-*O*-Acetyl-thymidin gibt 43% Dinucleotidester **12**.



	R ¹	R ²	R ³
13a	DMTr	C ₆ H ₅ CO	CH ₃ OCH ₂ CO
b	H	C ₆ H ₅ CO	CH ₃ OCH ₂ CO
c	H	H	H

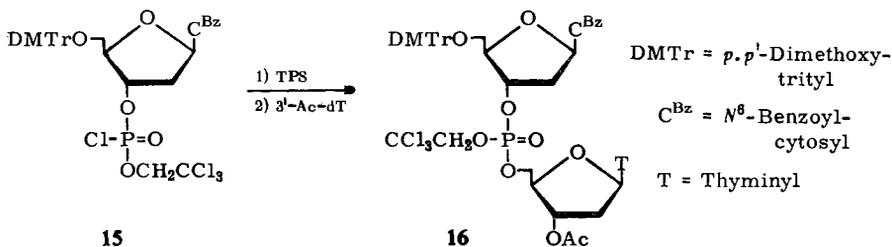
	R ¹	R ²	R ³
14a	DMTr	C ₆ H ₅ CO	CH ₃ OCH ₂ CO
b	H	C ₆ H ₅ CO	CH ₃ OCH ₂ CO
c	H	H	H
d	DMTr	C ₆ H ₅ CO	H
e	DMTr	H	H

An Stelle von Acetylthymidin kann auch ein Desoxyadenosinderivat in die Reaktion eingesetzt werden. Ein solches Derivat sollte an der 3'-OH-Gruppe eine Schutzgruppe tragen, die zum Verlängern der Oligonucleotidkette unter Bedingungen abgespalten werden kann, unter denen neben der Trichloräthylgruppe auch die Benzoylgruppe

¹⁴⁾ H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3821 (1963).

stabil ist. Dies trifft für die von *Reese*¹⁵⁾ eingeführte Methoxyacetylgruppe zu, die mit $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ bei 0° hydrolysiert werden kann. Setzt man **11** mit 3'-*O*-Methoxyacetyl-*N*⁶-benzoyl-desoxyadenosin und TPS um, so erhält man **14a** mit 40% Ausbeute (bezogen auf das Nucleosid), das durch Behandlung mit Essigsäure in **14b** übergeführt werden kann. Die analoge Umsetzung von **11** mit **14b** führt mit 56% Ausbeute zu **13a**. Bei den von uns angewendeten Bedingungen können wir keine Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung beobachten.

5'-*O*-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-*N*⁶-benzoyl-desoxycytidin läßt sich ebenfalls mit Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid zu **15** phosphorylieren und mit TPS und Acetylthymidin zu **16** umsetzen (Ausb. 32%).



Vor der Entfernung der Trichloräthylgruppe aus den Verbindungen **12**, **13a**, **14a** und **16** wird erst die Dimethoxytritylgruppe durch Behandlung mit 80proz. Essigsäure bei Raumtemp. (1 Stde.) abgespalten. Die Reaktionsprodukte werden durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Die Ausbeuten liegen durchweg bei 80–90%. Man kann dann entweder erst die Trichloräthylgruppe, wie für die Thymidinderivate beschrieben, und anschließend die Benzoylgruppe mit NH_3 abspalten oder nach *Letsinger* erst die Benzoylgruppe mit *Hydrazin*¹⁶⁾ und dann die Trichloräthylgruppe entfernen. Bei der Hydrazinbehandlung wird auch die Methoxyacetylgruppe abgespalten. Nach unseren Erfahrungen ergeben beide Verfahren etwa die gleichen Ausbeuten (Tab. 2).

Tab. 2. Ausbeuten für die adenosin- bzw. cytidinhaltigen Oligonucleotide nach der papierchromatographischen Reinigung

Ausgangs-material	Menge μMol	Produkt	% Ausb.	Abspaltungsmethode (S. 2365)
14c	2.5	d(ApA)	48	d
14a	12.5	d(ApA)	41	b
13c	1.7	d(ApApA)	66	c
12	3.3	d(ApT)	42	b
16	3.3	d(CpT)	69	b

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die Triestermethode durchaus in den Ausbeuten mit der Diestermethode konkurrieren kann. Besonders hervorzuheben ist, daß bei der Triestermethode bei wachsender Kettenlänge die Ausbeuten nicht absin-

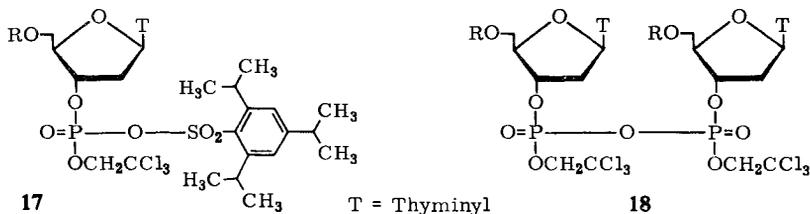
¹⁵⁾ C. B. Reese und J. C. M. Stewart, *Tetrahedron Letters* [London] **1968**, 4273.

¹⁶⁾ R. L. Letsinger, P. S. Müller und G. W. Grams, *Tetrahedron Letters* [London] **1968**, 2621.

ken, man also keinen wachsenden Überschuß an einer Komponente einsetzen muß wie bei der Diestermethode. Darüber hinaus ist bei der hier beschriebenen Methode der Arbeitsaufwand geringer.

Mechanismus der Aktivierung durch TPS

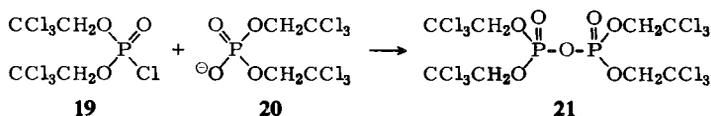
Die Aktivierung der Desoxynucleosid-3'-phosphorsäure-trichloräthylester durch TPS kann entweder in der Bildung eines gemischten Anhydrids vom Typ **17** oder eines Pyrophosphorsäure-tetraesters **18** bestehen.



Beide Verbindungen könnten durch den nucleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe eines Nucleosid zur Bildung eines Dinucleosid-phosphorsäure-trichloräthylesters führen. Durch Verfolgung der Aktivierungs- und Kondensationsreaktion mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie versuchten wir die Frage nach der phosphorylierenden Spezies zu klären.

Setzt man das Pyridiniumsalz von **2** in Pyridin ($\delta = +5.0$ ppm) mit 2 oder 4 Äquiv. TPS um, so findet man nach ca. 30 Min. nur *ein* Signal ($\delta = +33$ ppm), das bei Zugabe von Wasser vollkommen verschwindet; statt dessen erscheint das Signal für **2** wieder. Gibt man aber Acetylthymidin (1 Äquiv.) zu, so entsteht zusätzlich ein neues Signal ($\delta = +8.6$ ppm), das der Verbindung **3** zuzuordnen ist und nach Zugabe von Wasser nicht verschwindet. Die Verbindung mit der chemischen Verschiebung $\delta = +33$ ppm ist also offenbar ein Phosphorylierungsmittel.

In THF oder Pyridin zeigt Phosphorsäure-bis-trichloräthylester-chlorid (**19**) *ein* Signal ($\delta = -6.5$ ppm). Bei Anwesenheit von Spuren Feuchtigkeit bildet sich neben diesem Signal ein neues ($\delta = +34.5$ ppm), das nur dem Tetrakis-trichloräthylpyrophosphat (**21**) zugeordnet werden kann, das sich nach folgender Gleichung bildet:



Zugabe eines Überschusses an Wasser führt zur Hydrolyse von **21** unter Bildung von **20** ($\delta = +7.2$ ppm). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der chemischen Verschiebung von **21** mit derjenigen der durch Umsetzung von **2** mit TPS erhaltenen nehmen wir an, daß es sich bei letzterer ebenfalls um ein Tetraesterpyrophosphat, und zwar um **18** handelt.

Nach unserer Ansicht besteht daher die Aktivierung mit TPS in der Bildung von **18**. Versuche zu dessen Isolierung waren bis jetzt erfolglos, obwohl wir bei der Umsetzung von **2** mit TPS dünn-schichtchromatographisch ein Produkt mit hohem R_F -Wert beobachten können, das aber wegen seiner großen Hydrolyseempfindlichkeit nicht rein isoliert werden konnte.

In Tab. 3 sind die chemischen Verschiebungen einiger Phosphorsäure-trichloräthylester-Derivate zusammengefaßt.

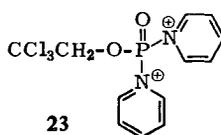
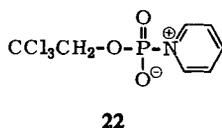
Tab. 3. ^{31}P -NMR-Signale (δ -Werte) von Phosphorsäure-trichloräthylester-Derivaten *)

Substanz	δ [ppm]
Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthylester}]$ -dichlorid	-12 **)
Phosphorsäure-bis- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthylester}]$ -chlorid (19)	-6.5 **)
Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthylester}]$	+3.2
21	+34.5
20	+7.2
2	+5.0
3	+8.6
8a	+8.6
18	+33
d(TppT)	+21.5

*) Lösungsmittel Pyridin, innerer Standard 30proz. Phosphorsäure.

**) Der gleiche Wert in THF.

Phosphorsäure-trichloräthylester-dichlorid und Phosphorsäure-bis-trichloräthylester-chlorid zeigen sowohl in Pyridin wie auch in THF jeweils dieselbe chemische Verschiebung. Dieser Befund spricht dagegen, daß sich beim Lösen der Chloride in Pyridin Verbindungen des Typs **22** bzw. **23** bilden, für die man einen vom Chlorid verschiedenen δ -Wert erwarten sollte.



Die Autoren danken Herrn Prof. *F. Cramer* für großzügige Unterstützung und anregende Diskussionen, Fräulein *G. Westphal* für geschickte Mitarbeit. Diese Arbeit wurde zum Teil von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* mit einer Sachbeihilfe unterstützt.

Beschreibung der Versuche

Pyridin und Dimethylformamid wurden über Calciumhydrid, Chloroform über Phosphor-pentoxid getrocknet, destilliert und über Calciumhydrid bzw. Phosphor-pentoxid aufbewahrt. Tetrahydrofuran wurde zunächst unter Rückfluß über Kaliumhydroxid und Zinn(II)-chlorid, dann über Natrium gekocht, destilliert und schließlich über Natrium aufbewahrt.

Alle zur Kondensation verwendeten Nucleoside und Nucleotide wurden mit absol. Pyridin 3 mal an der Ölpumpe bis zur Trockne eingengt. Gehalts- bzw. Ausbeutebestimmungen (Angaben in Optical Density-Einheiten = OD) wurden durch spektrophotometrische Messungen mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. UV-Spektren wurden mit dem Cary 15, die ^{31}P -NMR-Spektren mit einem Perkin-Elmer R 10 Spektrometer in Verbindung mit einem Northern Scientific NS 594 Digital Memory Oscilloscope aufgenommen. Die ^1H -NMR-Spektren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. M. Schiebel mit einem Varian HA 100-Spektrophotometer im Institut für Molekulare Biologie, Biochemie und Biophysik, Stöckheim, gemessen. Die Ausgangssubstanzen Thymidin, Desoxyadenosin und Desoxycytidin wurden von den Firmen Schwarz Bio-research, Inc., Mount Vernon, New York, und der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim, bezogen. Die verwendeten Enzyme lieferten C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, und Worthington Biochemical Corp., New Jersey. Alle Substanzen wurden zur Analyse bis zur Gewichtskonstanz bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

Chromatographie: Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Merck Dünnschicht-Fertigplatten Kieselgel F 254, zur präparativen Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel PF 254 beschriebene Platten verwendet, Laufmittel Gemisch A oder B. Nach dem Auskratzen der gewünschten Zonen wurde im Gemisch J 15 Min. gerührt, das feinverteilte Kieselgel über eine Säule gegeben und mit Gemisch J eluiert.

Zur Papierchromatographie (PC) wurde das Papier von Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen) benutzt und mit Laufmittel I absteigend entwickelt. Die gewünschten Zonen wurden herausgeschnitten und mit Gemisch K 4–5 Stdn. eluiert. Zum Nachweis der Trityl- bzw. *p,p'*-Dimethoxy-tritylgruppe wurde mit 10proz. Perchlorsäure besprüht und 3 Min. auf 100° erwärmt.

Folgende Laufmittel bzw. Lösungsmittelgemische wurden verwendet:

Laufmittel		v/v
A	Chloroform/Methanol	95:5
B	Chloroform/Methanol	93:7
C	Chloroform/Methanol	9:1
D	Chloroform/Methanol	8:2
E	Chloroform/Methanol	7:3
F	n-Butanol/Eisessig/Wasser	5:2:3
G	Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser	7:1:2
H	Äthanol/1 m Ammoniumacetat	5:2
I	Äthanol/1 m Ammoniumacetat	7:3
Gemisch		
J	Chloroform/Methanol	1:1
K	Methanol/Wasser	1:1

Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-äthylester}]\text{-dichlorid}^9)$: Zu 95.5 ccm (1 Mol) frisch dest. *Phosphoroxychlorid* und 96.5 ccm (1 Mol) $\beta,\beta,\beta\text{-Trichlor-äthanol}$ in 200 ccm absol. Äther wurden bei -10° langsam innerhalb 1 Stde. 80.5 ccm (1 Mol) absol. *Pyridin* getropft und

10 Min. bei -10° stehengelassen. Das ausgefallene Pyridiniumchlorid wurde unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit abfiltriert und mit absol. Äther gewaschen. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer i. Vak. vom Äther befreit und der ölarartige Rückstand i. Hochvak. destilliert. Sdp._{0,1} $56-58^{\circ}$, Ausb. 180 g (68%).

$C_2H_2Cl_5O_2P$ (265.3) Ber. C 9.21 H 0.76 Cl 66.57 P 11.63
Gef. C 9.23 H 0.86 Cl 66.50 P 11.54

5'-O-Trityl-thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (2): Zur Lösung von 0.2 ccm (1.25 mMol) *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 4 ccm absol. *Pyridin* wurden 10000 OD (267) (1 mMol) *5'-O-Trityl-thymidin* in 6 ccm absol. *Pyridin* innerhalb von 6 Stdn. langsam bei Raumtemp. unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß ($CaCl_2$) getropft. Nach 15 Stdn. wurde die Reaktion mittels DC auf Vollständigkeit geprüft. Dann gaben wir 5 ccm *Wasser* bei 0° zu und brachten den pH-Wert durch sofortige *Triäthylamin*-Zugabe auf 8. Nach 2 Stdn. wurde bis zur Trockne eingengt und der Rückstand durch präparative DC in Laufmittel E getrennt. NH_4^+ -Salz: Schmp. $226-227^{\circ}$. Ausb. 8870 OD (267) = 630 mg farblose Kristalle (89%). R_F (DC/Laufmittel E) 0.50. — UV (Methanol): λ_{max} 267 nm (ϵ 9600).

$NH_4[C_{31}H_{29}Cl_3N_2O_8P]$ (712.9) Ber. C 52.35 H 4.77 Cl 14.90 N 5.89 P 4.44
Gef. C 50.20 H 4.44 Cl 14.69 N 3.87 P 4.54

5'-O-Trityl-thymidyl-(3'-5')-3'-O-acetyl-thymidin-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (3)

a) Aus *5'-O-Trityl-thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (2): 6000 OD (267) (0.6 mMol) 2 (*Triäthylammoniumsalz*) wurden am Ionenaustauscher (Merck I, *Pyridinium*-Form) in das *Pyridiniumsalz* übergeführt. Nach der Absolutierung mit *Pyridin* wurde in 3 ccm absol. *Pyridin* mit 0.35 g (1.2 mMol) *2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid* versetzt, nach 2 Stdn. eine Lösung von 5800 OD (267) (0.6 mMol) *3'-O-Acetyl-thymidin* in 3 ccm absol. *Pyridin* zugegeben, nach weiteren 12 Stdn. zur Trockne eingengt und der Rückstand auf präparativen Dünnschichtplatten (Laufmittel B) aufgetrennt. Aus Äthanol Schmp. $127-130^{\circ}$. Ausb. 6500 OD (267) = 312 mg amorphes Pulver (55%, bezogen auf Acetylthymidin), R_F (DC/Laufmittel A) 0.73. — UV (Methanol): λ_{max} 263 nm (ϵ 19200).

$C_{43}H_{44}Cl_3N_4O_{13}P$ (962.2) Ber. C 53.67 H 4.61 Cl 11.05 N 5.82 P 3.29
Gef. C 53.94 H 4.58 Cl 11.00 N 5.82 P 3.22

b) Aus *5'-O-Trityl-thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-chlorid* (1): 9600 OD (267) (1 mMol) *5'-O-Trityl-thymidin* wurden mit *Pyridin* absolutiert und in 6 ccm absol. *Pyridin* unter Feuchtigkeitsausschluß in 6 Stdn. unter Rühren bei Raumtemp. zu einer Lösung von 0.16 ccm (1.0 mMol) *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 4 ccm absol. *Pyridin* getropft. Nach 15 Stdn. wurde durch DC (Laufmittel A) auf Vollständigkeit der Reaktion geprüft. Das gesamte UV-aktive Material blieb am Start.

Es wurden 3000 OD (267) (0.3 mMol) *3'-O-Acetyl-thymidin* mit dieser Lösung des Chlorids versetzt. Nach 20 Stdn. Rühren bei Raumtemp. zogen wir das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer ab und trennten den Rückstand durch präparative DC (Laufmittel B). Ausb. 5570 OD (267) = 270 mg (93%, bezogen auf Acetylthymidin). Die Verbindung war mit der unter a) beschriebenen identisch.

c) Aus *5'-O-Trityl-thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-chlorid* (1) und *2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid*: Zu 9700 OD (267) (1 mMol) *5'-O-Trityl-thymidin* in 6 ccm absol. *Pyridin* wurden langsam (6 Stdn.) unter Rühren bei Raumtemp. 0.16 ccm (1 mMol) *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 4 ccm *Pyridin* gegeben. Nach 15 Stdn. prüften wir auf Vollständigkeit des Umsatzes durch DC (Laufmittel A). Dann wurde unter

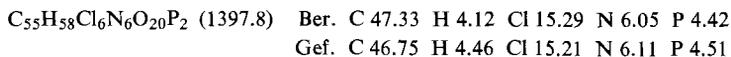
Feuchtigkeitsausschluß mit 0,3 g (1 mMol) des *Sulfochlorids* versetzt, 1 Stde. bei Raumtemp. stehengelassen, anschließend mit 6000 OD (267) (0,6 mMol) 3'-*O*-Acetyl-thymidin vermischt, nach 15 Stdn. Rühren bei Raumtemp. das Pyridin eingedampft und der Rückstand durch präparative DC getrennt. Ausb. 9600 OD (267) = 460 mg (80%, bezogen auf Acetylthymidin), identisch mit der unter a) beschriebenen Verbindung.

5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-3')-5'-*O*-trityl-thymidin-[β,β,β -trichlor-äthylester]: 20000 OD (267) (2 mMol) 5'-*O*-Trityl-thymidin (mit Pyridin absolutiert) in 5 ccm absol. THF wurden mit 0,16 ccm (1 mMol) Phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-dichlorid in 10 ccm absol. THF und 0,5 ccm absol. Pyridin versetzt und 48 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand auf präparativen Dünnschichtplatten (Laufmittel A) getrennt. Ausb. 5000 OD (267) = 300 mg amorphes Pulver (25%). R_F (DC/Laufmittel A) 0,79. — UV (Methanol): λ_{\max} 263 nm ($\epsilon = 19200$).

5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-thymidin-[β,β,β -trichlor-äthylester] (5a): 22000 OD (263) (1,1 mMol) 3 wurden in 20 ccm Methanol mit 20 ccm konz. Ammoniak 1 Stde. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Einengen im Rotationsverdampfer bis zur Trockne wurde der Rückstand durch präparative DC (Laufmittel B) aufgetrennt. Ausb. 19800 OD (263) = 830 mg amorphes Pulver (90%). R_F (DC/Laufmittel B) 0,43. — UV (Gemisch J): λ_{\max} 263 nm ($\epsilon = 19200$).

5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-tris-[β,β,β -trichlor-äthylester] (7a): 19800 OD (263) (1 mMol) 5a (absolutiert) in 6 ccm absol. Pyridin wurden innerhalb von 6 Stdn. langsam in eine Lösung von 0,16 g (1 mMol) Phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-dichlorid in 4 ccm absol. Pyridin getropft. Nach 15 Stdn. Rühren bei Raumtemp. zeigte die DC eine vollständige Phosphorylierung. Diese 5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-thymidylsäure-*P,P'*-bis-[β,β,β -trichlor-äthylester]-*P'*-chlorid (6)-Lösung wurde direkt mit 0,3 g (1 mMol) 2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid vermischt. Nach 1 Stde. wurden 17000 OD (263) (0,83 mMol) 4 hinzugefügt und 15 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Durch Eindampfen des Lösungsmittels und Auftrennen über präparative DC (Laufmittel B) erhielt man 16430 OD (263) = 790 mg 7a (48,3%, bezogen auf 5a). R_F (DC/Laufmittel B) 0,48. — UV (Gemisch J): λ_{\max} 263 nm ($\epsilon = 38200$).

5'-*O*-Trityl-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-bis-[β,β,β -trichlor-äthylester] (8a): Zur Lösung von 0,16 ccm (1 mMol) Phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-dichlorid in 4 ccm absol. Pyridin wurden 10000 OD (267) (1 mMol) 5'-*O*-Trityl-thymidin in 10 ccm absol. Pyridin innerhalb von 6 Stdn. unter Rühren getropft. Diese Lösung von 5'-*O*-Trityl-thymidin-3'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-chlorid (1) wurde nach weiteren 15 Stdn. mit 0,3 g (1 mMol) 2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid und nach einer weiteren Stde. mit 18000 OD (263) (0,9 mMol) Thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-[β,β,β -trichlor-äthylester] (4) versetzt und 40 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Dann wurde i. Vak. zur Trockne eingengt und das Produkt durch präparative DC (Laufmittel B) gereinigt. Aus Äthanol Schmp. 140—144°. Ausb. 17700 OD (263) = 860 mg amorphes Pulver (65,5%, bezogen auf 4). R_F (DC/Laufmittel B) 0,51. — UV (Methanol): λ_{\max} 263 nm ($\epsilon = 28800$).



Beispiel zur Abspaltung der 5'-Tritylgruppe

Thymidylyl-(3'-5')-3'-*O*-acetyl-thymidin-[β,β,β -trichlor-äthylester] (4): 22000 OD (263) (1,1 mMol) 3 wurden in 20 ccm 80proz. Essigsäure 15—20 Min. bei 100° im Ölbad unter Rühren erwärmt. Nach Erkalten wurde die Essigsäure im Rotationsverdampfer abgezogen,

der Rückstand in Chloroform gelöst und durch präparative DC (Laufmittel B) gereinigt. Ausb. 18000 OD (263) = 685 mg amorphes Pulver (82%). R_F (DC/Laufmittel B) 0.40. — UV (Methanol): λ_{\max} 263 nm (ϵ 19200).

Es ist streng darauf zu achten, daß das Produkt vollkommen von Essigsäure befreit ist, was durch Dickschichtchromatographie allein nicht immer möglich ist, da sonst in Gegenwart von TPS eine Acetylierung von **4** zu dem Diacetylprodukt stattfindet.

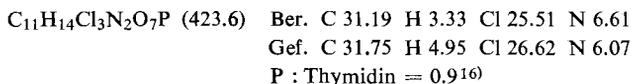
Tab. 3. Zusammenfassung der Ergebnisse bei der Abspaltung der 5'-Tritylgruppe

Ausgangsmaterial	Menge	Produkt	% Ausb.	R_F (DC)
3	1.1 mMol	4	82	Laufmittel B: 0.42
5a	10 μ Mol	5b	80	Laufmittel B: 0.14
8a	10 μ Mol	8b	69	Laufmittel B: 0.40
7a	10 μ Mol	7b	81	Laufmittel B: 0.38
2	2 mMol	9	85	

Thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**9**): 19200 OD (263) (2 mMol) **2** wurden in 20 ccm 80proz. Essigsäure 20 Min. bei 100° im Ölbad unter Rühren erwärmt. Nach Erkalten wurde die Essigsäure im Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Chloroform/Methanol (95 : 5, v/v) gelöst und durch präparative DC (Laufmittel B) gereinigt. Das Material an der Startzone ist das gewünschte Produkt **9**. Elektrophoretisch und papierchromatographisch stimmt es mit Thymidin-5'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]⁴⁾ überein.

Nach Überführung in das *Triäthylammonium-Salz* Ausb. 16 300 OD (263) = 460 mg amorphes Pulver (85%).

Thymidin-3':5'-cyclophosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**10**): 14400 OD (267) (1.5 mMol) *Thymidin-3'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (**9**) wurden in das *Pyridiniumsalz* übergeführt und in 5 ccm absol. Pyridin mit 2.0 g 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid versetzt. Nach 12 Stdn. wurden 0.2 ccm Wasser zugegeben und nach 1 Stde. zur Trockne eingedampft. Nach Trennung auf Dickschichtplatten (Laufmittel B) Ausb. 2500 OD (267) = 110 mg (17%). Die Substanz ist amorph. R_F (DC/Laufmittel B) 0.63. — UV (Methanol): λ_{\max} 263 nm (ϵ 9600).



3'-O-Acetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin: 3.5 g (10 mMol) *N⁶-Benzoyl-desoxyadenosin* wurden mit 3.75 g (10.1 mMol) *p.p'-Dimethoxy-tritylchlorid* in 25 ccm absol. *Pyridin* versetzt. Nach 15 Stdn. wurde in Eiswasser gegossen, die ausgefallene Substanz in Essigsäure-äthylester aufgenommen, nach Trocknung über Natriumsulfat zur Trockne eingeeengt, das entstandene *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin* absolutiert, in 20 ccm absol. *Pyridin* mit 1.2 ccm (11.8 mMol) *Acetanhydrid* versetzt. Nach 15 Stdn. gossen wir in Eiswasser, schüttelten das ausgefallene Material 3–4 mal mit je 200 ccm Essigester aus, trockneten die organische Phase über Natriumsulfat und verdampften das Lösungsmittel.

¹⁶⁾ Bestimmt nach E. J. King, *Biochem. J.* **26**, 292 (1932).

Das entstandene 5'-O-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-3'-O-acetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin wurde in 5 ccm Methanol mit 50 ccm 80proz. Essigsäure versetzt und nach 1 Stde. bei Raumtemp. zur Trockne eingengt. Durch mehrmalige Kodestillation mit Wasser wurde die Essigsäure entfernt. Die Substanz wurde in Chloroform über eine Kieselgelsäule chromatographiert. Zunächst wurde mit 1 l voreluert (verworfen), anschließend mit 2 l Laufmittel A eluiert (Fraktionen von 200–250 ccm). Frakt. 4 enthielt reines 3'-O-Acetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin. Ausb. 120 000 OD (280) = 2.3 g (60%) farblose Kristalle vom Schmp. 167–168° (aus Äthanol). R_F (DC/Laufmittel A) 0.48.

UV (Gemisch J): λ_{\max} 280 nm (ϵ 20700).

NMR (Pyridin-d₅): τ = 8.0 (3H, s) (–O–COCH₃).

C₁₉H₁₉N₅O₅ (397.4) Ber. C 58.42 H 4.82 N 17.63 Gef. C 57.81 H 5.50 N 16.82

3'-O-Methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin: Darstellung wie vorstehend mit 1.8 ccm Methoxyacetanhydrid. Ausb. 54% farblose Kristalle vom Schmp. 126–130° (aus Äthanol). R_F (DC/Laufmittel A) 0.52.

UV (Gemisch J): λ_{\max} 280 nm (ϵ 20700).

NMR (CD₃OD): τ = 5.9 (2H, s) (–O–COCH₂OCH₃), 6.6 (3H, s) (–O–COCH₂OCH₃).

C₂₀H₂₁N₅O₆ (427.4) Ber. C 56.65 H 4.94 N 16.35 Gef. C 56.54 H 5.01 N 16.47

5'-O-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-3'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester] (II): Zu 3.2 ccm (20 mMol) Phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-dichlorid in 50 ccm absol. Pyridin wurde eine Lösung von 400 000 OD (280) (20 mMol) absolutiertem 5'-O-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin in 150 ccm absol. Pyridin gestroft (Feuchtigkeitsausschluß, 6–8 Stdn.). Die Reaktion wurde durch DC verfolgt. Nach 15 Stdn. wurde eine Lösung von 5 ccm Triäthylamin in 20 ccm Wasser unter Eiskühlung zugegeben, das Lösungsmittel eingedampft und der Rückstand in Chloroform über eine Kieselgelsäule (Laufmittel C) chromatographiert. Die Substanz ist amorph. Ausb. 32 000 OD (280) = 1.45 g (81%). R_F (DC/Laufmittel E) 0.74. — UV (Methanol): λ_{\max} 280 nm (ϵ 20700).

(C₂H₅)₃NH]C₄₀H₃₆Cl₃N₅O₉P (970.2) Ber. C 56.93 H 6.80 Cl 10.96 N 8.66 P 3.19
Gef. C 49.17 H 4.36 Cl 11.52 N 7.99 P 3.76

5'-O-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-3'-O-methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-[β,β,β -trichlor-äthylester] (14a): 400 000 OD (280) (20 mMol) 5'-O-[*p,p'*-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin in 15 ccm absol. Pyridin wurden innerhalb 6 Stdn. zu einer Lösung von 3.2 ccm (20 mMol) Phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]-dichlorid in 5 ccm Pyridin gegeben. Nach 15 Stdn. war die Phosphorylierung beendet. Zu dieser Lösung wurden 6.0 g (20 mMol) 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid und nach 2 Stdn. 191 000 OD (280) (10 mMol) absolutiertes 3'-O-Methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin gegeben. Wir ließen 40 Stdn. bei Raumtemp. stehen und chromatographierten dann auf präparativen Dünnschichtplatten (Laufmittel A). Die Substanz ist amorph. Ausb. 150 000 OD (280) = 4.63 g (40%, bezogen auf 3'-O-Methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin). R_F (DC/Laufmittel A) 0.44. — UV (Methanol): λ_{\max} 280 nm (ϵ 41400).

C₆₀H₅₆Cl₃N₁₀O₁₄P (1278.5) Ber. C 56.37 H 4.41 Cl 8.32 N 10.95 P 2.42
Gef. C 56.84 H 5.23 Cl 7.00 N 11.40 P 1.64

N⁶-Benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-3'-O-methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-[β,β,β -trichlor-äthylester] (14b): 30 000 OD (280) (0.75 mMol) 14a wurden in 20 ccm Methanol mit 50 ccm 80proz. Essigsäure 1 Stde. bei Raumtemp. behandelt. Dann wurde zur Trockne eingengt und der Rückstand durch präparative DC aufgetrennt (Laufmittel B). Ausb. 20 000 OD (280) = 477 mg amorphes Pulver (67%). R_F (DC/Laufmittel B) 0.53. — UV (Methanol): λ_{\max} 280 nm (ϵ 41400).

5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-N⁶-benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-3'-O-methoxyacetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-bis-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**13a**): Eine Lösung von 30000 OD (280) (1.5 mMol) *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin* in 10 ccm Pyridin wurde innerhalb 6 Stdn. zu einer Lösung von 0.32 ccm (2 mMol) *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 5 ccm Pyridin getropft. Nach 15 Stdn. wurde dünnschichtchromatographisch (Laufmittel B) auf Vollständigkeit des Umsatzes geprüft. Zu dieser Lösung wurden 0.45 g (1.5 mMol) *2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid* und nach 1 Stde. 11500 OD (280) (0.3 mMol) absolutiertes **14b** gegeben. Nach 24 Stdn. engten wir zur Trockne ein und trennten den Rückstand auf präparativen Dünnschichtplatten (Laufmittel A). Ausb. 9400 OD (280) = 277 mg amorphes Pulver (56%, bezogen auf **14b**). R_F (DC/Laufmittel A) 0.32. — UV (Methanol): λ_{\max} 280 nm (ϵ 62100).

5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-3'-O-acetyl-thymidin-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**12**): 20000 OD (280) (1 mMol) *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin* wurden absolutiert, in 6 ccm absol. Pyridin aufgenommen und innerhalb 6 Stdn. unter Feuchtigkeitsausschluß zu einer Lösung von 0.2 ccm (1.2 mMol) *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 4 ccm Pyridin getropft. Nach 15 Stdn. wurde auf vollständige Phosphorylierung durch DC geprüft und die Lösung direkt zu 7000 OD (267) (0.7 mMol) *3'-O-Acetyl-thymidin* (absolutiert) gegeben. Wir ließen 48 Stdn. bei Raumtemp. stehen, dampften daraufhin das Lösungsmittel ein und trennten den Rückstand durch präparative DC (Laufmittel B). Ausb. 9000 OD (274) = 490 mg amorphes Pulver (43%, bezogen auf Acetylthymidin). R_F (DC/Laufmittel A) 0.48. — UV (Gemisch J): λ_{\max} 272 nm.

$C_{52}H_{51}Cl_3N_7O_{14}P$ (1134.4) Ber. C 55.01 H 4.52 Cl 9.35 N 8.64 P 2.73
Gef. C 52.31 H 4.88 Cl 13.4 N 8.18 P 2.76

5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxyadenylyl-(3'-5')-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**14d**): Zu 500 OD (280) (12.5 μ Mol) **14a** in 1.5 ccm Methanol wurde bei 0° 1.0 ccm mit NH_3 gesättigtes Methanol gegeben. Nach 10 Min. wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand über präparative Dünnschichtplatten (Laufmittel B) getrennt und das Produkt isoliert. Ausb. 300 OD (280) (60%). R_F (DC/Laufmittel B) 0.55. — UV (Methanol): λ_{\max} 280 nm (ϵ 41400).

5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenosin-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**14e**): 150 OD (280) (3.25 μ Mol) **14a** wurden in 1 ccm *Hydrazinhydrat*-Lösung (0.1 ccm Hydrazinhydrat in 3 ccm Pyridin/Essigsäure 4:1 v/v) gelöst. Nach 16 Stdn. bei Raumtemp. wurden 2 ccm Wasser zugegeben, mit Chloroform ausgeschüttelt, die organische Phase zur Trockne eingengt und durch DC (Laufmittel C) gereinigt. Ausb. 67 OD (259) (60%). R_F (DC/Laufmittel B) 0.31. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 30000).

Desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenosin-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**14c**): Die Lösung von 67 OD (259) (1.5 μ Mol) **14e** in 3 ccm 80proz. *Essigsäure* wurde nach 1 Stde. bei Raumtemp. zur Trockne eingengt und das Reaktionsgemisch durch DC getrennt (Laufmittel D). Ausb. 48 OD (259) (72%). R_F (DC/Laufmittel D) 0.33. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 30000).

Desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenosin-bis-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester] (**13c**): 10000 OD (280) (0.17 mMol) **13a** wurden in 20 ccm *Hydrazinhydrat*-Lösung (1.0 ccm Hydrazinhydrat in 30 ccm Pyridin/Essigsäure 4:1 v/v) gelöst. Nach 16 Stdn. bei Raumtemp. wurden 30 ccm Wasser zugegeben, mit Chloroform ausgeschüttelt, die organische Phase eingengt und der Rückstand mittels DC (Laufmittel D) auf Reinheit geprüft.

Der entstandene *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenosin-bis-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* wurde ohne nähere Untersuchung in 5 ccm Methanol mit 20 ccm 80proz. *Essigsäure* versetzt. Nach 1 Stde. bei Raumtemp. engten wir

zur Trockne ein. Nach präparativer DC (Laufmittel D) Ausb. 3600 OD (259) (48%, bezogen auf **13a**). R_F (PC/Laufmittel I) 0.76. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 45000).

*N*⁶-Benzoyl-desoxycytidin¹⁷⁾: 7.2 g *Desoxycytidin-hydrochlorid* wurden in Wasser über eine Ionenaustauschersäule (Merck III, OH[⊖]-Form) geschickt. 21000 OD (23 mMol) *Desoxycytidin* wurden nach Trocknen in 600 ccm Methanol mit 6 g *Benzoessäureanhydrid* unter Rückfluß gekocht (bei 80°). Nach 1/2 Stde. und nach 3 Stdn. wurden jeweils weitere 6 g *Benzoessäureanhydrid*, in wenig Methanol gelöst, zugegeben und weitere 2 Stdn. gekocht. Dann wurde das Lösungsmittel eingedampft, der farblose Rückstand in Wasser (400 ccm) und Äther (400 ccm) suspendiert, die wäbr. Phase 3 mal mit Äther ausgeschüttelt, um überschüssiges *Benzoessäureanhydrid* und *Benzoessäure* zu entfernen, das Produkt aus Wasser umkristallisiert und über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 4.3 g (60%), Schmp. 190–192° (Lit.¹⁴⁾: 194°). R_F (DC/Laufmittel C) 0.38. — UV (Gemisch J): λ_{\max} 259 nm (ϵ 21800), 304 (11800).

5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxycytidyl-(3'-5')-3'-O-acetyl-thymidin-[β.β.β-trichlor-äthylester] (**16**): 22000 OD (260) (1 mMol) *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxycytidin*¹⁴⁾ wurden absolutiert, in 6 ccm absol. Pyridin aufgenommen und langsam (6 Stdn.) zu 0.20 ccm (1.2 mMol) *Phosphorsäure-[β.β.β-trichlor-äthylester]-dichlorid* in 4 ccm absol. Pyridin getropft. Nach 15 Stdn. wurde durch DC festgestellt, daß das gesamte Nucleosid reagiert hatte. Das entstandene *5'-O-[p.p'-Dimethoxy-trityl]-N⁶-benzoyl-desoxycytidin-3'-phosphorsäure-[β.β.β-trichlor-äthylester]-chlorid* (**15**) wurde ohne nähere Charakterisierung sogleich mit 0.30 g (1 mMol) *2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid* und 2 Stdn. später mit 7000 OD (267) (0.7 mMol) *3'-O-Acetyl-thymidin* in 5 ccm absol. Pyridin umgesetzt. Nach 48 Stdn. wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch präparative DC (Laufmittel A) getrennt. Ausb. 10000 OD (263) = 352 mg amorphes Pulver (32%, bezogen auf Acetylthymidin). R_F (DC/Laufmittel A) 0.49. — UV (Gemisch J): λ_{\max} 262 nm (ϵ 31400).

Beispiele für die Abspaltung der Trichloräthylgruppe (S. 2365)

Methode a: 200 OD (263) (10 μMol) *Thymidyl-(3'-5')-thymidin-[β.β.β-trichlor-äthylester]* (**5b**) wurden in 3 ccm 80proz. *Essigsäure* mit einer Spatelspitze *Zinkstaub* 1 Stde. bei Raumtemp. geschüttelt. Dann wurde vom Zink abfiltriert, mit 20proz. *Essigsäure* gewaschen, das Filtrat zur Trockne eingengt, der Rückstand in 2 ccm Wasser gelöst, die Lösung über eine Ionenaustauschersäule (Merck I, H[⊕]-Form) gegeben. Das mit Wasser erhaltene Eluat wurde mit NH₃ eingengt (bzw. beim Vorhandensein einer 3'-Acetylgruppe erst 2 Stdn. stehengelassen) und durch PC (Laufmittel I) gereinigt. Ausb. 146 OD (263) (73%) *Thymidyl-(3'-5')-thymidin*. R_F (PC/Laufmittel I) 0.67. — UV (Methanol): λ_{\max} 263 nm (ϵ 19200).

Methode b

Desoxyadenyl-(3'-5')-desoxyadenosin: 370 OD (280) (8 μMol) **14b** wurden in 5 ccm DMF mit einer Spatelspitze *Cu/Zn* 1 Stde. bei 50° geschüttelt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit 20proz. *Essigsäure* wurde zur Trockne eingedampft, über eine Ionenaustauschersäule (Merck I, Pyridiniumform) gegeben, mit 20proz. *Pyridin* eluiert, das Eluat eingedampft, der Rückstand in 10 ccm Methanol gelöst und mit 30 ccm konz. *Ammoniak* versetzt. Nach 2 Tagen bei Raumtemp. wurde die Lösung zur Trockne eingengt und durch PC (Laufmittel H) gereinigt. (Bei Abwesenheit von *N*-Benzoylgruppen wird die NH₃-Behandlung unterlassen bzw. zur Abspaltung von *O*-Acetylgruppen auf 2 Stdn. begrenzt.) Ausb. 140 OD (259) (50%). R_F (PC/Laufmittel I) 0.69. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 30000).

Methode c

Desoxyadenyl-(3'-5')-desoxyadenyl-(3'-5')-desoxyadenosin: 100 OD (259) (1.7 μMol) **13c** wurden in 3.0 ccm *Pyridin* und 0.2 ccm *Eisessig* mit einer Spatelspitze *Zinkstaub* 1/2 Stde.

¹⁷⁾ Ausgearbeitet von G. Brockmann, Stöckheim.

bei Raumtemp. geschüttelt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Ionenaustauscher (Dowex 50, Pyridiniumform) wurde weitere 3 Min. geschüttelt, dann abfiltriert, auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 50, Pyridiniumform) gegeben, mit 20proz. Pyridin eluiert, die Lösung zur Trockne eingengt und durch PC (Laufmittel I) gereinigt. Ausb. 66 OD (269) (66%). R_F (PC/Laufmittel I) 0.30. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 62100).

Methode d

Desoxyadenylyl-(3'-5')-desoxyadenosin: 100 OD (259) (2.5 μ Mol) **14c** wurden in 1.5 ccm Dioxan/Wasser (4:1, v/v) mit 0.5 ccm 0.4*n* NaOH versetzt. Nach 5 Min. wurde mit Ionenaustauscher Dowex 50 (Pyridiniumform) versetzt, bis die Lösung neutral war, dann vom Ionenaustauscher abfiltriert, mit 50 ccm 20proz. Pyridinlösung nachgewaschen, das Filtrat zur Trockne eingengt und der Rückstand durch PC (Laufmittel I) gereinigt. Ausb. 48 OD (259) (48%). R_F (PC/Laufmittel I) 0.69. — UV (Methanol): λ_{\max} 259 nm (ϵ 30000).

Nucleotidabbau durch Phosphodiesterasen: Alle dargestellten Oligonucleotide wurden nach papierchromatographischer Reinigung mit Schlangengiftphosphodiesterase und in einigen Fällen auch mit Milzphosphodiesterase abgebaut. In allen Fällen ergab sich das geforderte Verhältnis an Nucleosid/Nucleotid.

Beispiel für den Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase: 10 OD *Desoxycytidylyl-(3'-5')-thymidin* in 0.1 ccm Tris-Puffer, pH 8.0 (0.1 *m*), wurden mit 10 μ l (10 μ g) Enzym-Lösung 15 Stdn. bei 37° inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch PC (Laufmittel I) getrennt und durch Vergleich mit authent. Material identifiziert. *Desoxycytidin/5'-O-Thymidylsäure* = 0.94 OD (270)/1.04 OD (265).

Beispiel für den Abbau mit Milzphosphodiesterase: Zu 10 OD *Desoxycytidylyl-(3'-5')-thymidin* in 0.1 ccm Ammonium-succinat-Puffer, pH 5.9, wurden 10 μ l Detergenz-Lösung (Tween, 1proz.) und 30 μ l (3.4 μ g Protein) Enzym-Lösung gegeben. Nach 4 Stdn. bei 37° wurden die Reaktionsprodukte durch PC (Laufmittel H) getrennt. *3'-O-Desoxycytidylsäure/Thymidin* = 0.40 OD (270)/0.49 OD (265).

[7/69]