

Wolfgang Freist, Rolf Helbig und Friedrich Cramer

2-[α -Pyridyl]-äthanol als Phosphatschutzgruppe

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 29. Oktober 1969)

Die Synthese von Desoxynucleosid-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylestern] mit weiteren Schutzgruppen an der 3'-Hydroxygruppe und der Aminogruppe (**3a–d**) wird beschrieben. Die *O*- und *N*-Schutzgruppen lassen sich selektiv mit Basen entfernen. Abspaltung der Phosphatschutzgruppe führt zu *N*-geschützten Desoxynucleotiden.

2-(α -Pyridyl)ethanol as Phosphate Protecting Group

The synthesis of 2-(α -pyridyl)ethyl deoxynucleoside-5'-phosphate carrying further protecting groups at the 3'-hydroxy group and the amino group (**3a–d**) is described. *O*- and *N*-protecting groups can be removed selectively in alkaline medium. Cleavage of the phosphate protecting group yields *N*-protected deoxynucleotides.

Für die Synthese von Oligonucleotiden sind mehrere Phosphatschutzgruppen beschrieben worden, so die alkalilabile β -Cyan-äthylgruppe¹⁾, die säurelabile Benzhydrylgruppe²⁾, die reduktiv entfernbare β,β,β -Trichlor-äthylgruppe³⁾, 2',3'-*O*-[2,4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin⁴⁾, das über eine Perjodat-Oxydation abgespalten wird, sowie *S*-Äthyl-thiophosphat⁵⁾, das sich mit Jod unter neutralen Bedingungen in das Phosphat überführen läßt. Eine weitere, neue Phosphatschutzgruppe liegt nach unseren Untersuchungen im 2-[α -Pyridyl]-äthanol (**1**) vor.

Die phosphatgeschützten Nucleotide erhält man durch Umsetzung von **1** mit den Pyridiniumsalzen der geschützten Nucleotide **2a–d** in absol. Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD). Da sie vollständig umgesetzt werden und keine Nebenprodukte auftreten, ist keine chromatographische Reinigung erforderlich.

Da die Phosphorsäure-pyridyläthylester gegen $2n$ NaOH und konz. Ammoniak relativ beständig sind, können aus den voll geschützten Nucleotiden entweder mit NaOH nur die 3'-*O*-Acetylgruppen oder mit Ammoniak die 3'-*O*- und die *N*-Schutzgruppen der Nucleoside selektiv abgespalten werden (vgl. Tab. 1).

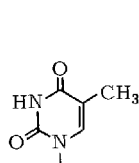
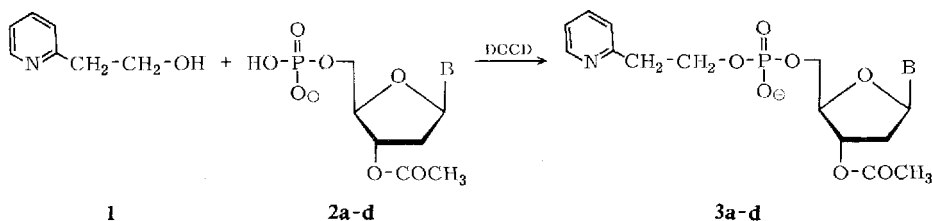
1) G. M. Tener, J. Amer. chem. Soc. **83**, 159 (1961).

2) F. Cramer und K. H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. **679**, 150 (1964).

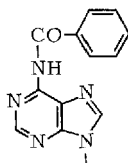
3) F. Eckstein, Chem. Ber. **100**, 2228, 2236 (1967).

4) F. Kathawala und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. **709**, 185 (1967); **712**, 195 (1968).

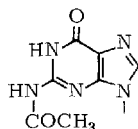
5) A. F. Cook, M. J. Holman und A. L. Nussbaum, J. Amer. chem. Soc. **91**, 1522 (1969).



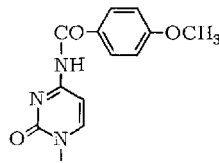
a: B = Thymyl



b: B = N^6 -Benzoyl-adenyl



c: B = N^2 -Acetyl-guanyl



d: B = N^4 -[4-Methoxybenzoyl]-cytosyl

Tab. 1. Behandlung der voll geschützten Nucleotide **3a–d** mit NaOH oder konz. Ammoniak

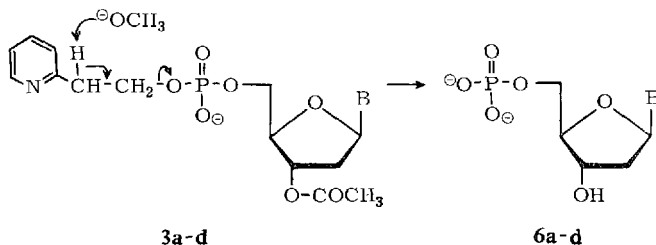
Ausgangssubstanz ^{a)}	Reaktionsprodukt mit 2 <i>n</i> NaOH	Ausb. ^{b)} (%)	Reaktionsprodukt mit NH ₃	Ausb. ^{b)} (%)
(Pyet)pdT(Ac) (3a)	(Pyet)pdT (4a)	95	(Pyet)pdT (4a)	96
(Pyet)pdbz ⁶ A(Ac) (3b)	(Pyet)pdbz ⁶ A (4b)	88	(Pyet)pdA (5b)	97
(Pyet)pdac ² G(Ac) (3c)	(Pyet)pdac ² G (4c)	60	(Pyet)pdG (5c)	77
(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C(Ac) (3d)	(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C (4d)	86	(Pyet)pdC (5d)	93

a) Pyet = 2-[α -Pyridyl]- α -thyl, (4-CH₃O)bz = 4-Methoxy-benzoyl.

b) Spektrophotometrisch bestimmt.

Während die voll geschützten Nucleotide **3a–d** sowohl in Wasser als auch in Pyridin leicht löslich sind, sind die nach Abspaltung der 3'-*O*- und der *N*-Schutzgruppen der Basen erhaltenen geschützten Nucleotide **5b–d** nur noch in Wasser, aber nicht mehr in Pyridin löslich. In den NMR-Spektren der geschützten Nucleotide **4a** und **5b–d** liegen die Signale der Pyridin-Protonen bei τ 1.6–1.8 (α -Stellung), 2.6–2.9 (β -Stellung) und 2.2–2.4 (γ -Stellung), die Methylengruppen der Seitenkette erscheinen als Triplett bei τ 5.8–6.05 und 6.9–7.1 ($J = 3.5$ Hz).

Die Abspaltung der Pyridyläthylgruppe gelingt mit Na-Methylat in Methanol/Pyridin oder *K*-tert.-Butylat in tert.-Butylalkohol/Pyridin, nach unserer Annahme wie bei der Cyanäthylgruppe¹⁾ durch β -Eliminierung:



B siehe bei 2,3

Unter diesen Bedingungen werden aus den voll geschützten Nucleotiden die 3'-O-Schutzgruppen mit abgespalten, die N-Schutzgruppen der Basen sind jedoch weitgehend stabil (Tab. 2).

Tab. 2. Behandlung der voll geschützten Nucleotide **3a**–**d** mit NaOCH₃

Ausgangssubstanz	Reaktionsprodukt	% Ausb. *)
(Pyet)pdT(Ac) (3a)	pdT (6a)	97
(Pyet)pdbz ⁶ A(Ac) (3b)	pdbz ⁶ A (6b)	84
(Pyet)pdac ² G(Ac) (3c)	pdac ² G (6c)	87
(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C(Ac) (3d)	pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C (6d)	80
(Pyet)pdT (4a)	pdT (6a)	62

*) Spektrophotometrisch bestimmt.

Die nur an der Phosphatgruppe geschützten Nucleotide **5b**–**d** eignen sich wegen der ungünstigen Löslichkeitsverhältnisse in Methanol/Pyridin nicht gut als Ausgangsstufe für die Abspaltung der Pyridyläthylgruppe.

In der 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe liegt eine Phosphatschutzgruppe vor, die leicht eingeführt werden kann und alkalibeständig ist und deshalb für die Synthese von Oligonucleotiden verwendet werden kann.

Wir danken Frau E. Kassner für geschickte Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde mit Calciumhydrid getrocknet. Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer RPQ 20 durchgeführt, die NMR-Spektren mit dem NMR-Spektrometer HA 100 der Varian Ass. aufgenommen. Die Papierchromatogramme (Papier Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen) wurden absteigend entwickelt mit den Laufmitteln A = Äthanol/1*m* Ammoniumacetat (5:2, v/v) und B = *n*-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55:10:35, v/v). Für die Elektrophorese wurden Whatman 3 MM-Papier und Phosphatpuffer Titrisol pH 7 benutzt.

Darstellung der voll geschützten Nucleotide 3a–d: 0.55 mMol der geschützten Nucleotide **2a**–**d** wurden mit 5.5 mMol 2-[α -Pyridyl]-äthanol (**1**) durch dreimaliges Eindampfen mit etwa 20 ccm absol. Pyridin wasserfrei gemacht. Dann wurde in 20 ccm absol. Pyridin aufgenommen, mit 5 mMol Dicyclohexylcarbodiimid etwa 15 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt und dann mit 10 ccm Wasser versetzt. Nach 1 stdg. Schütteln wurde die Lösung eingengt, der ausgefallene Harnstoff abfiltriert, das Filtrat mit etwa 20 ccm Wasser verdünnt, die Hauptmenge des überschüss. Pyridyläthanol durch achtmaliges Ausschütteln mit ~10 ccm Chloroform herausgewaschen, die wäbr. Phase i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit wenig Pyridin aufgenommen. Durch Eintropfen in etwa 300 ccm Äther wurde das geschützte Nucleotid (**3a**–**d**) ausgefällt. Nach Abgießen des Äthers wurde der Niederschlag noch zweimal in 200 ccm Äther aufgewirbelt und der Äther wiederum abgegossen, dann der Rückstand i. Vak. von Ätherresten befreit und in Pyridin oder Wasser aufgenommen (Tab. 3).

Abspaltung der 3'-O-Acetylgruppen: Etwa 0.01 mMol der geschützten Nucleotide **3a**, **b** und **d** wurden jeweils 60 Min., **3c** 50 Min., mit 1 ccm Pyridin/2*n* NaOH (1:1) bei Raumtemp. geschüttelt. Dann wurde mit der Pyridiniumform von Ionenaustauscher Merck I neutralisiert und das Reaktionsgemisch papierchromatographisch (System A) getrennt. Die Ausbeuten an

Tab. 3. Daten der geschützten Nucleotide **3a–d**

-5'-phosphorsäure- [2-(α -pyridyl)-äthylester]	Ausb. System (%)	R_F System A	Beweglich- keit*) bei pH 7	λ_{max} (in H ₂ O) (ϵ -Wert berechnet)
3'-O-Acetyl-thymidin- (3a)	85	0.74	0.54	260 m μ ($\epsilon = 11900$) Sch 266, 277 m μ
3'-O-Acetyl-N ⁶ -benzoyl- desoxyadenosin- (3b)	70	0.80	0.47	279 m μ ($\epsilon = 18400$) Sch 267, 259.5 m μ
3'-O-N ² -Diacetyl- desoxyguanosin- (3c)	75	0.73	0.53	258 m μ ($\epsilon = 19700$) Sch 280, 254 m μ
3'-O-Acetyl-N ⁴ -[4-methoxy- benzoyl]-desoxycytidin- (3d)	66	0.82	0.32	300 m μ ($\epsilon = 22400$) Sch 260, 266 m μ

*¹) Bezogen auf die ungeschützten Nucleotide.

4a–d wurden spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 1). Als Nebenprodukte traten hauptsächlich die Nucleotide **5b–d** auf. Die UV-Kurven von **4a–d** stimmen mit denen von **3a–d** überein.

Thymidin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**4a**): R_F 0.66 (System A).

N⁶-Benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**4b**): R_F 0.73 (System A).

N²-Acetyl-desoxyguanosin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**4c**): R_F 0.64 (System A).

N⁴-[4-Methoxy-benzoyl]-desoxycytidin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**4d**): R_F 0.75 (System A).

Abspaltung der 3'-O- und N-Schutzgruppen: Von **3a** wurden 6550 OD = 0.55 mMol, von **3b** 6320 OD = 0.343 mMol, von **3c** 8580 OD = 0.437 mMol und von **3d** 544 OD = 0.0243 mMol 45 Stdn. bei Raumtemp. mit konz. Ammoniak stehengelassen. Bei **3a** wurde die Lösung i. Vak. eingedampft und das entstandene geschützte Nucleotid **4a** mit Hilfe der Pyridiniumform von Ionenaustauscher Merck I in das Pyridiniumsalz übergeführt. Dann wurde das Nucleotid aus wenig Pyridin mit Äther gefällt. Nach zweimaligem Aufwirbeln des Niederschlages mit Äther wurde in Wasser gelöst, mehrmals mit konz. Ammoniak eingedampft und das geschützte Nucleotid nach Gefriertrocknung als blaßgelbes, feines Pulver erhalten. Ausb. 6280 OD = 0.528 mMol (96%) **4a**, Ammoniumsalz.

NMR (in D₂O, innerer Standard TMS⁶): Pyridin τ 1.60 (m) (1 α -H), 2.64 (m) (2 β -H), 2.20 (m) (1 γ -H); $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 5.81 (t, $J = 3.5$ Hz) und 6.92 (t, $J = 3.5$ Hz) (jeweils 2H); Protonen der Base: CH₃ 8.28 (s) (3 H), 6-H 2.50 (s) (1H); 1'-H 3.85 (t, $J = 3.5$ Hz) (1H); 2'-H 7.80 (m) (2H); 3'-H 5.52 (m) (1H); 4'-H 5.94 (m) (1H); 5'-H 6.10 (m) (2H).

NH₄C₁₇H₂₁N₃O₈P (444.4) Ber. C 45.95 H 5.68 N 12.61 P 6.97

Gef. C 45.84 H 5.72 N 12.66 P 6.84

Die geschützten Nucleotide **5b–d** wurden nach Abdampfen des Ammoniaks i. Vak. auf eine Säule von Whatman DE 52-Cellulose gegeben und mit einem linearen Gradienten von 0.01–0.1 *m* Ammoniumcarbonatlösung eluiert. Als Nebenprodukte traten vor allem die ungeschützten Nucleotide pdA, pdG und pdC auf. **5b–d** lagen nach Gefriertrocknung

⁶) 3-Trimethylsilyl-propan-sulfonsäure-(1).

aus Wasser als völlig farblose feine Pulver vor. Ausbeuten: (Pyet)pdA (**5b**) 6140 OD = 0.333 mMol (97%), (Pyet)pdG (**5c**) 5430 OD = 0.336 mMol (77%), (Pyet)pdC (**5d**) 247 OD = 0.0226 mMol (93%).

Desoxyadenosin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**5b**): NMR (D_2O , innerer Standard TMSP⁶⁾): Pyridin τ 1.78 (m) (1 α -H), 2.86 (m) (2 β -H) und 2.4 (m) (1 γ -H); $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 6.05 (t, $J = 3.5$ Hz) und 7.10 (t, $J = 3.5$ Hz) (jeweils 2 H); Protonen der Base: 2-H 1.72 (s) (1 H), 8-H 1.90 (s) (1 H); 1'-H 3.64 (t, $J = 3.5$ Hz) (1 H), 2'-H 7.34 (m) (2 H), 3'-H 5.32 (m) (1 H), 4'-H 5.80 (m) (1 H), 5'-H 6.05 (m) (2 H).

$\text{NH}_4\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ (453.4) Ber. C 45.26 H 5.34 N 21.63 P 6.83

Gef. C 45.12 H 5.46 N 21.61 P 6.65

Desoxyguanosin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**5c**): NMR (D_2O , innerer Standard TMSP⁶⁾): Pyridin τ 1.68 (m) (1 α -H), 2.78 (m) (2 β -H), 2.32 (m) (1 γ -H); $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 6.05 (t, $J = 3.5$ Hz) und 7.05 (t, $J = 3.5$ Hz) (jeweils 2 H); 8-H der Base 2.07 (s) (1 H); 1'-H 3.80 (t, $J = 3.5$ Hz) (1 H), 2'-H 7.40 (m) (2 H), 3'-H 5.32 (m) (1 H), 4'-H 5.85 (m) (1 H), 5'-H 6.05 (m) (2 H).

$\text{NH}_4\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$ (469.4) Ber. C 43.50 H 5.15 N 20.89 P 6.60

Gef. C 43.69 H 5.02 N 20.43 P 6.70

Desoxycytidin-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**5d**): NMR (D_2O , innerer Standard TMSP⁶⁾): Pyridin τ 1.60 (m) (1 α -H), 2.65 (m) (2 β -H) und 2.20 (m) (1 γ -H); $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 5.80 (t, $J = 3.5$ Hz) und 6.90 (t, $J = 3.5$ Hz) (jeweils 2 H); Protonen der Base: 5-H 4.12 (m) (1 H) und 6-H 2.28 (d, $J = 3.5$ Hz) (1 H); 1'-H 3.76 (t, $J = 3.5$ Hz) (1 H), 2'-H 7.86 (m) (2 H), 3'-H 5.55 (m) (1 H), 4'-H 5.9 (m) (1 H), 5'-H 6.1 (m) (2 H).

Tab. 4. Daten der geschützten Nucleotide **4a** und **5b-d**

		R _V -Werte		Beweglichkeit *)	λ_{max} (in H ₂ O)
		System A	System B	bei pH 7	(ϵ -Werte berechnet)
(Pyet) pdT	(4a)	0.66	0.71	0.53	260 m μ ($\epsilon = 11900$) Sch 266, 277 m μ
(Pyet)pdA	(5b)	0.55	0.75	0.54	259 m μ ($\epsilon = 18450$) Sch 265 m μ
(Pyet)pdG	(5c)	0.47	0.65	0.54	254 m μ ($\epsilon = 16170$) Sch 265, 280 m μ
(Pyet)pdC	(5d)	0.58	0.74	0.52	261 m μ ($\epsilon = 10800$) und 266 m μ ($\epsilon = 10800$) Sch 277 m μ

*) Bezogen auf die ungeschützten Nucleotide.

Abspaltung der Pyridyläthylgruppe: Etwa 0.01 mMol der geschützten Nucleotide **3a-d** und **4a** wurden durch dreimaliges Versetzen mit absol. Pyridin und Eindampfen zur Trockne wasserfrei gemacht und in 0.5 ccm absol. Pyridin aufgenommen. Dann wurden 0.5 ccm methanolische Natriummethylat-Lösung (9.2 g Natrium auf 100 ccm Methanol) hinzugegeben und das Gemisch 48 Stdn. bei 0° stehengelassen. Anschließend wurde mit der Pyridiniumform von Ionenaustauscher Merck 1 neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft, das Reaktionsgemisch papierchromatographisch (System A) aufgetrennt und die Ausb. spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 2). Als Nebenprodukte traten im Falle von **3b-d** die ungeschützten Nucleotide pdA, pdG und pdC auf.

[412/69]