

## Kinetik der Schutzgruppenabspaltung an Nucleosiden mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Walter Regel\*, Eberhard Stengele und Hartmut Seliger

Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg i. Br.,  
D-7800 Freiburg i. Br., Stefan-Meier-Straße 31

Eingegangen am 6. November 1973

Die Lage des Basenprotons 6-H im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Pyrimidin-Nucleosiden ist beim ungeschützten Nucleosid verschieden von derjenigen eines in 3'- oder 5'-Stellung geschützten Nucleosids. Durch Integration beider Peaks in Abhängigkeit von Zeit, Konzentration und pH-Wert konnte erstmals eine quantitative Hydrolysekinetik durchgeführt werden. — Verbesserte und z. T. neue Vorschriften zur Darstellung von tritylierten Pyrimidin-Nucleosiden werden beschrieben.

### Hydrolysis Kinetics of Nucleoside Protective Groups Using $^1\text{H}$ -N.M.R. Spectroscopy

The chemical shift of the proton 6-H of pyrimidine nucleoside bases in unprotected nucleosides is different from that in 3' or 5' protected nucleosides. By integrating both peaks repeatedly, as a function of time, concentration, and pH value, accurate kinetic data could, for the first time, be obtained. — Improved and, in some cases, new procedures for preparation of tritylated pyrimidine nucleosides are described.

Die Abspaltungsreaktion von Schutzgruppen, die für die chemische Synthese von Oligonucleotiden von besonderer Bedeutung sind, z. B. Trityläthergruppen, wurde bisher in Ermangelung geeigneter Methoden nur qualitativ verfolgt<sup>1-4</sup>). Durch die Anwendung einer neuen — auf der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie beruhenden Methode — gelang die Ausarbeitung eines quantitativen Verfahrens mit großem Anwendungsbereich zur Bestimmung kinetischer Daten solcher Reaktionen.

Das Verfahren wurde an den Verbindungen **1b–h** erprobt, für deren Herstellung verbesserte und z. T. neue Synthesewege beschrieben werden.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Pyrimidin-Nucleosiden zeigen, daß die chemischen Verschiebungen aller Protonen des Basen- und des Zuckerteils sich ändern, wenn das Nucleosid an C-3' bzw. C-5' mit Schutzgruppen substituiert wird<sup>5</sup>). Demnach lassen sich in einer Lösung, die sowohl geschütztes wie ungeschütztes Nucleosid

<sup>1</sup>) K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion und H. G. Khorana, *Angew. Chem.* **84**, 489 (1972); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **11**, 451 (1972).

<sup>2</sup>) H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 3821 (1963).

<sup>3</sup>) M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 430 (1962).

<sup>4</sup>) F. Cramer, H. P. Bär, H. J. Rhaese, W. Sängner, K. H. Scheit, G. Schneider und J. Tennigkeit, *Tetrahedron Lett.* **1963**, 1039.

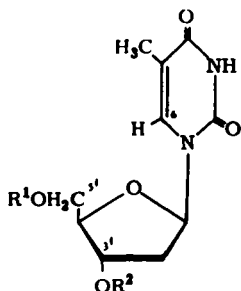
<sup>5</sup>) P. O. P. Ts'o, M. P. Schweizer und D. P. Hollis, *Ann. N. Y. Acad. Sic.* **158**, 256 (1969).

enthält, zwei Resonanzen für jede Protonensorte beobachten, deren Intensitäten der jeweiligen Konzentration proportional sind. Im Fall der Verbindungen **1b–e** werden die Signale des Protons an C-6 weder von denjenigen des Lösungsmittels noch von den übrigen Resonanzen des Nucleosids und der Schutzgruppe überdeckt und eignen sich deshalb zur Aufnahme einer Schutzgruppenkinetik.

Bei den Verbindungen **1f–h** waren dagegen diese Signale durch die Resonanzen der Tritylgruppen so überlagert, daß keine quantitativen Messungen durchgeführt werden konnten. Die chemische Verschiebung von 6-H für **1b–e** sowie für Thymidin (**1a**) sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1. Chemische Verschiebung von 6-H in den geschützten Pyrimidin-Nucleosiden **1a–e**, Lösungsmittel CD<sub>3</sub>OD

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	δ(ppm) von 6-H
<b>1a</b>	H	H	7,81
<b>b</b>	Trityl	H	7,64
<b>c</b>	<i>p</i> -Methoxytrityl	H	7,66
<b>d</b>	<i>p, p'</i> -Dimethoxytrityl	H	7,68
<b>e</b>	H	<i>p</i> -Methoxytrityl	7,65
<b>f</b>	Trityl	Trityl	
<b>g</b>	<i>p</i> -Methoxytrityl	<i>p</i> -Methoxytrityl	
<b>h</b>	<i>p, p'</i> -Dimethoxytrityl	<i>p, p'</i> -Dimethoxytrityl	



Besondere experimentelle Schwierigkeiten bestehen darin, ein Lösungsmittel zu finden, das die Einstellung eines definierten pH-Wertes erlaubt und in dem sich sowohl geschütztes als auch ungeschütztes Nucleosid in einer für die NMR-Spektroskopie hinreichenden Konzentration lösen. Für die von uns untersuchten Derivate (**1b–e**) erwies sich eine 1:1-Mischung von Tetrahydrofuran und H<sub>2</sub>O als geeignet. Die Anfangskonzentration an geschütztem Thymidin war jedoch stets kleiner als 0,08 mol/Liter, so daß sich die Messungen an der unteren Grenze der für konventionelle NMR-Geräte vertretbaren Konzentration bewegten. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Der Auswertung lag das integrierte Geschwindigkeitsgesetz einer Reaktion 2. Ordnung zugrunde, das sich wegen des großen Überschusses an H<sub>2</sub>O zu einem Gesetz pseudoerster Ordnung vereinfacht.

Tab. 2. Geschwindigkeitskonstanten der säurekatalysierten Schutzgruppenabspaltung

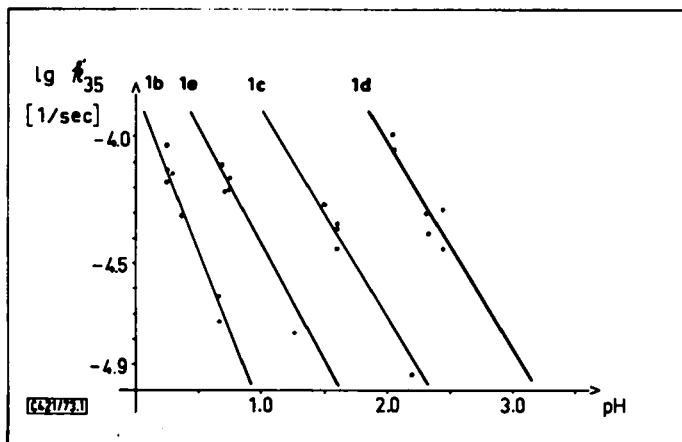
	<b>1b</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>	<b>1e</b>
10 <sup>4</sup> k <sub>35</sub> [Liter · mol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> ]	1.22 ± 0.21	17.3 ± 1.6	133 ± 21	3.46 ± 0.23

Den Ergebnissen läßt sich entnehmen, daß die Einführung einer *p*-Methoxygruppe in den Tritylrest die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor 14 erhöht. Die Einführung einer zweiten *p*-Methoxygruppe erhöht die Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor 109 gegenüber der unsubstituierten Tritylgruppe, was mit qualitativen

Beobachtungen der Arbeitsgruppe um *Khorana*<sup>1)</sup> übereinstimmt. Der Vergleich von 3'- mit 5'-geschütztem Nucleosid zeigt eine fünfmal größere Geschwindigkeitskonstante für das 5'-geschützte Nucleosid.

Zwischen dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung ( $k'_{35}$  [s<sup>-1</sup>]) und dem pH-Wert wurde lineare Abhängigkeit gefunden (Abb.).

Die relativ großen mittleren Fehler könnten durch Einsatz eines modernen Pulse-Fourier-Transform-Spektrometers wesentlich verringert werden.



Abhängigkeit des lg der Geschwindigkeitskonstanten  $k'_{35}$  vom pH-Wert

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

## Experimenteller Teil

2'-Desoxythymidin \*) war ein Produkt der Fa. PWA, Pharma Waldhof, Mannheim. Triphenylchloromethan wurde von E. Merck, Darmstadt, *p*-Methoxy- und *p,p'*-Dimethoxytritylchlorid von Ega-Chemie, Steinheim/Albuch, erhalten. Zur Aufnahme von UV-Spektren standen Geräte der Fa. Zeiß (PMQ II und DMR 21) zur Verfügung, für IR-Spektren ein Perkin-Elmer-Infracord. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit einem HA-100(MHz)-Gerät der Firma Varian AG gemessen. Die rechnerische Auswertung erfolgte auf einer Univac-1106 Anlage des Rechenzentrums der Universität Freiburg. Alle kinetischen Messungen erfolgten bei 35°C. Der pH-Wert wurde mit verd. Salzsäure so eingestellt, daß sich eine Reaktionsdauer von ca. 10 h ergab. In Abständen von 40 min wurden jeweils mehrere Integrationen durchgeführt, so daß den in Tab. 2 angegebenen Daten je ca. 250 Einzelintegrationen zugrunde liegen.

Chromatographische Trennungen wurden auf Kieselgel-Dünnschichtfolien der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel, bzw. in präparativem Maßstab auf PSC-Fertigplatten und Säulen mit Silicagel (0.2–0.5 nm Korngröße) der Fa. E. Merck durchgeführt. Elementaranalysen wurden in diesem Institut von Herrn O. Windisch angefertigt.

Die chromatographische Reinheit der Verbindungen 1b–h wurde durch Dünnschichtchromatographie in Äther (Laufmittel A), Essigester (Laufmittel B) und Chloroform/Methanol 95:5 (Laufmittel C) nachgeprüft. Die Substanzen waren in allen drei Laufmitteln einheitlich.  $R_F$ -Werte siehe Tab. 3.

\*) Nach IUPAC streng als Thymidin zu bezeichnen.

Tab. 3.  $R_F$ -Werte in der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel

Substanz	Laufmittel		
	A	B	C
<b>1a</b>	0.0	0.02	0.02
<b>b</b>	0.04	0.27	0.25
<b>c</b>	0.04	0.23	0.25
<b>d</b>	0.03	0.24	0.28
<b>e</b>	0.07	0.30	0.36
<b>f</b>	0.27	0.53	0.60
<b>g</b>	0.20	0.51	0.61
<b>h</b>	0.14	0.49	0.62

**5'-Trityldesoxythymidin (1b):** In Abwandlung einer Vorschrift von Gilham und Khorana<sup>6)</sup> wurde wie folgt verfahren: 5.0 g Desoxythymidin und 7.0 g Tritylchlorid wurden in 100 ml Pyridin 30 min auf 100°C erhitzt. Das Gemisch wurde langsam unter Rühren in Eiswasser gefällt. Die zunächst gelbe, ölige Fällung wurde nach eintägigem Stehenlassen weiß und pulvrig. Das Produkt wurde dann abgesaugt, getrocknet und in einem Soxhlet über Nacht mit Cyclohexan ausgezogen. Erweichungspunkt 123–125°C, Schmp. 158°C (Lit.<sup>6)</sup>: 125 bzw. ca. 160°C). Ausb. 7.8 g (78 %).

UV (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  = 267 nm,  $\lambda_{\min}$  = 244 nm. — IR (KBr): 698, 1670, 3490  $\text{cm}^{-1}$ .

Eine Analysenprobe wurde bei 100°C i. Hochvak. getrocknet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$  (484.6) Ber. C 71.88 H 5.82 N 5.78 Gef. C 72.34 H 5.93 N 5.42

**5'-(*p*-Methoxytrityl)desoxythymidin (1c):** Der Syntheseweg von Schaller et al.<sup>2)</sup> wurde stark vereinfacht, so daß beliebige Mengen von 1c ohne Säulentrennung hergestellt werden können: 24.2 g (100 mmol) Desoxythymidin wurden in 200 ml trockenem Pyridin gelöst, 31.2 g (114 mmol) *p*-Methoxytritylchlorid (umkrist. aus Cyclohexan) zugegeben, und der Ansatz über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Pyridin wurde dann i. Vak. abgezogen, Reste durch Äthanolzusatz und mehrmaliges Eindampfen vollständig entfernt. Der Rückstand wurde mehrere Stunden mit 300 ml Cyclohexan behandelt, wobei ein großer Teil des Methoxytrityläthyläthers in Lösung ging und dekantiert wurde. Das verbleibende Produkt wurde zwischen Äther und Wasser verteilt, die Ätherphase bis zur quantitativen Entfernung von Thymidin mit Wasser ausgezogen (Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie in Essigester und THF). 1c wurde aus der Ätherlösung im zehnfachen Vol. Cyclohexan gefällt, abgesaugt und i. Hochvak. getrocknet. Schmp. (unkorr.) 106°C (Lit.<sup>2)</sup>: 103–105°C). Ausb. 48.4 g (94 %).

UV (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  = 268 nm,  $\lambda_{\min}$  = 244 nm. — IR (KBr): 696, 1670, 3480  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$  (514.5) Ber. C 69.95 H 5.88 N 5.45 Gef. C 70.45 H 5.82 N 5.09

**5'-(*p,p'*-Dimethoxytrityl)desoxythymidin (1d)** wurde in geringfügiger Abwandlung einer Vorschrift von Schaller et al.<sup>2)</sup> dargestellt.

**3'-(*p*-Methoxytrityl)desoxythymidin (1e):** Darstellung nach Ogilvie und Letsinger<sup>7)</sup> aus 5'-(Isobutyloxycarbonyl)desoxythymidin und *p*-Methoxytritylchlorid.

<sup>6)</sup> P. T. Gilham und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 6212 (1958).

<sup>7)</sup> K. K. Ogilvie und R. L. Letsinger, J. Org. Chem. **32**, 2365 (1967).

Analog wurde versucht, 5'-(Isobutyloxycarbonyl)desoxythymidin mit Tritylchlorid bzw. *p,p'*-Dimethoxytritylchlorid umzusetzen. Die Reaktionen führten nicht zu den gewünschten Produkten.

*3',5'-Bis(trityl)desoxythymidin (1f)*: 1.46 g Desoxythymidin wurden mit 60 ml trockenem Pyridin versetzt und zur Entfernung von Wasserspuren zweimal eingeengt, dann wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht. 20 g Tritylchlorid wurden hinzugefügt und 3 d bei 50°C gerührt. Überschüssiges Tritylchlorid wurde über Nacht durch 50 ml absol. Methanol zersetzt, Pyridin abgezogen, Reste mit Wasser azeotrop abdestilliert. Der Rückstand wurde in 500 ml Wasser und 500 ml Chloroform aufgenommen, die Wasserphase noch zweimal mit je 300 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Chloroformextrakt wurde durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgelplatten in Laufmittel C aufgetrennt. Die Produktzone wurde mit Dioxan eluiert: **1f** aus Dioxanlösung lyophilisiert. Ausb. 3.32 g (70%), Schmp. (unkorr.) 122–124°C.

UV (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  = 268 nm,  $\lambda_{\min}$  = 246 nm. — IR (KBr): 703, 1450, 1490, 1600, 3460 cm<sup>-1</sup>.

Eine Analysenprobe wurde aus Dioxanlösung in Wasser umgefällt.

C<sub>48</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (726.9) Ber. C 79.40 H 5.79 N 3.85 O 11.01  
Gef. C 79.36 H 6.24 N 3.77 O 10.88

*3',5'-Bis(p-methoxytrityl)desoxythymidin (1g)*: 1 g Desoxythymidin wurde mit 9 ml Pyridin versetzt und zum Entfernen von Wasserspuren zweimal eingeengt und mit trockenem Pyridin aufgefüllt. Dann wurden 4 g *p*-Methoxytritylchlorid zugesetzt und die Mischung 2 h unter Rückfluß gekocht. Danach wurde das Pyridin abgezogen, Reste durch weiteres Eindampfen mit Dioxan entfernt. Der Rückstand wurde aus Dioxan lyophilisiert, das Produkt mit Wasser, dann mit Cyclohexanon mehrmals ausgezogen. Dabei wurden Thymidin und *p*-Methoxytritylalkohol weitgehend entfernt. Der Rückstand, der im wesentlichen aus **1c**, **1e** und **1g** besteht, wurde auf eine Kieselgelsäule (4.5 × 100 cm) aufgegeben. Eluiert wurde mit je 2 bis 3 Liter Cyclohexan/Äther (4:1), Äther und Essigester. Fraktionen 1 und 2 (je 500 ml) enthielten das Hauptprodukt **1g**, das beim Eindampfen ausfiel und abfiltriert wurde. Ausb. 2.2 g (72%). Schmp. (unkorr.) 83°C. Aus den Fraktionen 4–8 wurden 90 mg **1c** als Nebenprodukt gewonnen.

UV (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  = 267 nm,  $\lambda_{\min}$  = 246 nm. — IR (KBr): 698, 1450, 1500, 1600, 1680, 3470 cm<sup>-1</sup> (Schulter).

C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (786.9) Ber. C 76.32 H 5.89 N 3.56 Gef. C 76.83 H 6.71 N 3.00

*3',5'-Bis(p,p'-dimethoxytrityl)desoxythymidin (1h)*: 1 g Desoxythymidin und 4.2 g *p,p'*-Dimethoxytritylchlorid wurden in 9 ml Pyridin 5 h im Dampfbad erhitzt. Das Pyridin wurde dann abgezogen und der Rückstand nach Entfernen restlichen Pyridins mit Dioxan auf eine Kieselgelsäule (3.5 × 80 cm) aufgegeben. Es wurde mit 2 Liter Cyclohexan, 3 Liter Cyclohexan/Äther (1:1) und 2 Liter Cyclohexan/Äther (2:3) eluiert, wobei Fraktionen zu je ca. 250 ml aufgefangen wurden. Die Fraktionen 20–22 enthielten reines **1h**. Sie wurden eingedampft, der Rückstand in wenig Cyclohexan/Benzol (1:1) gelöst und in Petroläther gefällt. Ausb. 500 mg (14%), Schmp. 121–123°C.

UV (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  = 270 nm,  $\lambda_{\min}$  = 253 nm. — IR (KBr): 698, 1450, 1500, 1600, 1680, 3490 cm<sup>-1</sup> (Schulter).

C<sub>52</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (847.0) Ber. C 73.74 H 5.95 N 3.30 Gef. C 72.42 H 6.33 N 2.72